

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



TESIS DOCTORAL

**Diversidad genética y persistencia ambiental de *Listeria Monocytogenes*
en dos plantas de procesamiento de carne de cerdo ibérico: influencia de la
resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María del Sagrario Ortiz Jareño

Directores

**Joaquín V. Martínez Suárez
Victoria López Alonso**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y PERSISTENCIA AMBIENTAL DE
LISTERIA MONOCYTOGENES EN DOS PLANTAS DE
PROCESADO DE CARNE DE CERDO IBÉRICO: INFLUENCIA DE
LA RESISTENCIA A DESINFECTANTES DE AMONIO
CUATERNARIO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María del Sagrario Ortiz Jareño

Directores

Joaquín V. Martínez Suárez

Victoria López Alonso

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y PERSISTENCIA AMBIENTAL DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES EN DOS PLANTAS DE PROCESADO DE CARNE DE
CERDO IBÉRICO: INFLUENCIA DE LA RESISTENCIA A
DESINFECTANTES DE AMONIO CUATERNARIO**

Memoria presentada por **María del Sagrario Ortiz Jareño** para la obtención del grado
de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directores: Dr. Joaquín V. Martínez Suárez y Dra. Victoria López Alonso

Departamento de Tecnología de Alimentos Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

EL DOCTORANDO

VºBº LOS DIRECTORES

Joaquín V. Martínez Suárez, Investigador del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, y Victoria López Alonso, Investigadora de la Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas del Instituto de Salud Carlos III

CERTIFICAN:

Que la Tesis doctoral titulada “Diversidad genética y persistencia ambiental de *L. monocytogenes* en dos plantas de procesado de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia de desinfectantes de amonio cuaternario” de la que es autora María del Sagrario Ortiz Jareño, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 1 de septiembre de 2015

Fdo.: Joaquín V. Martínez Suárez

Fdo.: Victoria López Alonso

A Javier, Natalia y Elena

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha sido financiado por los proyectos:

TRT2006-00048-00-00 “Desarrollo de un sistema de trazabilidad de subtipos moleculares de *Listeria monocytogenes* en una planta de matadero y despiece de cerdo ibérico”. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 2007-08. Investigador principal: Joaquín V. Martínez-Suárez.

RTA2008-00080-C02-01 “Diseño de un microarray de DNA para la detección rápida de los subtipos moleculares de *Listeria monocytogenes*: aplicación al estudio de la supervivencia de las diferentes cepas tras el procesado de productos cárnicos de cerdo ibérico”. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 2008-11. Investigadores principales: Joaquín V. Martínez-Suárez y Victoria López Alonso.

RTA2011-00098-C02-01 “Subtipos moleculares de *Listeria monocytogenes* de las cadenas de producción de carne de vacuno y de porcino: prevalencia en las granjas, persistencia en las plantas de productos elaborados y supervivencia al procesado de la carne. Implicaciones para la seguridad de los productos cárnicos listos para su consumo”. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 2012-14. Investigadores principales: Joaquín V. Martínez-Suárez y Victoria López Alonso.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

Muy especialmente a los directores, por su dedicación y paciencia. A Joaquín V. Martínez Suárez quiero agradecerle haberme dado la oportunidad de realizarla, y ser un estímulo y un ejemplo de constancia y trabajo para mí. A Victoria López Alonso quiero agradecerle su ayuda incondicional, su optimismo y que siempre tenga una sonrisa para hacer la vida más agradable a los que estamos a su alrededor. Por encima de todo, quiero agradecer a ambos la calidad humana que me han demostrado a lo largo de estos años.

A Pilar López, sin cuya colaboración en las labores técnicas no habría sido posible realizar este trabajo, gracias por su buen humor, y por ser una excelente compañera y amiga con la que poder contar en todo momento.

A Jaime Navas, por tener el placer de compartir con él los primeros años en el laboratorio, y por poder seguir disfrutando de su amistad.

A Daniel Bravo, por los ratos que pasamos en el laboratorio y por los cafés de la mañana.

A todos los integrantes del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA: Antonia Picón, Manuel Núñez, Margarita Medina, Pilar Gaya, Ana García, Máximo de Paz, Javier Tomillo, Juan Arqués, Eva Rodríguez, Sonia Garde, Marta Ávila, Susana Langa, José María Landete, Olga López, Ángela Peirotén, Lucía Robles, Javier Calzada, Ana del Olmo, Rakel Montiel, Nerea Martínez, Izaskun Martín, Natalia Gómez, Maite Díaz, Carmen Burbano, Carmen Cuadrado, Mercedes Martín, Blanca Cabellos y África Sanchiz, y a todos los estudiantes que con su “granito de arena” han contribuido a la realización de este trabajo.

A Cristina, Anita, María, Buenaventura, Inma, Elma, Gema, Bea y Tamar, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A Javier, Natalia y Elena, por los buenos y “no tan buenos” momentos que compartimos día a día, sin los que mi vida no tendría sentido.

A mis padres, por todo lo que he aprendido de ellos y espero seguir aprendiendo durante muchos años, a mis hermanas y al resto de mi familia.

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN.....	13
3.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	15
3.1.1. Taxonomía y características del género <i>Listeria</i>	15
3.1.2. La listeriosis	16
3.1.3. Patogenicidad de <i>L. monocytogenes</i>	17
3.2. <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN LOS ALIMENTOS Y EN EL AMBIENTE DE LAS PLANTAS DE PROCESADO DE ALIMENTOS	21
3.2.1. Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos.....	21
3.2.2. Rutas de contaminación y persistencia de <i>L. monocytogenes</i> en el ambiente de las plantas de procesado de alimentos	23
3.2.3. Factores asociados a la persistencia de <i>L. monocytogenes</i> en el ambiente de las plantas de procesado de alimentos.....	25
3.2.4. <i>L. monocytogenes</i> en la industria cárnica porcina.....	29
3.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	32
3.3.1. Detección de <i>L. monocytogenes</i>	32
3.3.1.1. Detección, aislamiento e identificación de <i>L. monocytogenes</i> de alimentos mediante técnicas convencionales	32
3.3.1.2. Detección y/o confirmación de <i>L. monocytogenes</i> de alimentos mediante técnicas rápidas.....	34
3.3.2. Identificación de subtipos	36
3.3.2.1. Técnicas fenotípicas de identificación de subtipos.....	36
3.3.2.2. Técnicas genotípicas de identificación de subtipos.....	36
3.3.3. Secuenciación del genoma completo	38
4. OBJETIVOS.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47

5.1. CEPAS DE COLECCIÓN	49
5.2. MEDIOS DE CULTIVO	50
5.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS ESTANDARIZADOS	51
5.4. TOMA DE MUESTRAS	51
5.4.1. Instalaciones incluidas en el estudio	51
5.4.2. Programa de muestreo	52
5.4.3. Procedimiento de muestreo	52
5.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	53
5.6. EXTRACCIÓN DE DNA.....	54
5.6.1. Lisados de colonias bacterianas	54
5.6.2. Obtención de DNA genómico purificado	54
5.7. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE DNA.....	54
5.8. SECUENCIACIÓN DE DNA	56
5.8.1. Secuenciación del gen <i>inlA</i> y de un fragmento del gen <i>prfA</i>	56
5.8.2. Secuenciación de genomas completos	56
5.8.3. Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis y la comparación de los genomas	57
5.9. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN DE SUBTIPOS DE <i>L.</i> <i>MONOCYTOGENES</i>	58
5.9.1. Identificación del serotipo molecular mediante PCR.....	58
5.9.2. Electroforesis en gel en campo pulsante	59
5.10. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN UN MODELO DE FERMENTACIÓN DE CHORIZO IBÉRICO.....	60
5.10.1. Cultivos bacterianos y condiciones de crecimiento	60
5.10.2. Elaboración, inoculación e incubación de las masas de embutido.....	61
5.10.3. Toma de muestras y análisis	62

5.10.4. Análisis estadístico de los resultados	62
5.11. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	62
5.11.1. Determinación cualitativa de la actividad hemolítica y fosfolipasa C	62
5.11.2. Determinación cuantitativa de la actividad hemolítica	63
5.12. ENSAYOS DE MOVILIDAD, CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	63
5.12.1. Determinación de la movilidad	63
5.12.2. Determinación de la capacidad de adhesión (<i>biofilm</i> de 48 h).....	64
5.12.3. Determinación del <i>biofilm</i> de siete días	64
5.12.4. Medida del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en el medio de formación de <i>biofilm</i>	64
5.12.5. Análisis estadístico de los resultados	65
5.13. ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	65
5.13.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima	65
5.13.1.1. Técnica de difusión en agar	65
5.13.1.2. Técnica de dilución en agar	66
5.13.2. Viabilidad de las células de <i>L. monocytogenes</i> en presencia de cloruro de benzalconio	67
5.14. DETECCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTENCIA A CLORURO DE BENZALCONIO.....	67
5.14.1. Genes <i>qacH</i> y <i>radC</i> asociados al transposón Tn6188.....	67
5.14.2 Determinante genético <i>bcrABC</i>	68
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
6.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS RUTAS DE CONTAMINACIÓN Y PATRONES DE PERSISTENCIA DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN LA PLANTA A	71
6.1.1 Detección de <i>L. monocytogenes</i>	71
6.1.2. Subtipos de <i>L. monocytogenes</i>	74

6.1.2.1. Serotipos moleculares	74
6.1.2.2. Pulsotipos	76
6.1.3. Diversidad genética de los subtipos identificados	80
6.1.4. Patrones de contaminación.....	80
6.1.4.1. Pulsotipos persistentes	80
6.1.4.2. Pulsotipos predominantes	81
6.2. VIABILIDAD DE DIFERENTES CEPAS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> AISLADAS EN LA PLANTA A, EN UN MODELO DE FERMENTACIÓN DE CHORIZO IBÉRICO ELABORADO CON DIFERENTES CULTIVOS PROTECTORES	84
6.2.1. Descenso del pH e inhibición del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	85
6.2.2. Reducción de la viabilidad de las cepas de <i>L. monocytogenes</i>	88
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PULSOTIPOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> IDENTIFICADOS EN LA PLANTA A.....	90
6.3.1. Factores de virulencia	90
6.3.1.1. Marcadores fenotípicos de la virulencia.....	90
6.3.1.2. Mutaciones en los genes <i>prfA</i> e <i>inlA</i>	93
6.3.2. Susceptibilidad a antimicrobianos.....	96
6.3.2.1. Susceptibilidad a cloruro de benzalconio y cloruro de cadmio	96
6.3.2.2. Susceptibilidad a antibióticos	97
6.4. RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LOS PULSOTIPOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> Y SU “SUPERVIVENCIA” A LA DESINFECCIÓN EN LA PLANTA A	100
6.4.1. Características asociadas a la “supervivencia”	101
6.4.2. Genotipos de resistencia a cloruro de benzalconio	102
6.4.3. Fenotipos de resistencia y susceptibilidad	103
6.5. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE CLORURO DE BENZALCONIO SOBRE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	104

6.5.1. Formación de <i>biofilm</i> en ausencia de cloruro de benzalconio	105
6.5.2. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en el medio de formación de <i>biofilm</i> ...	106
6.5.3. Formación de <i>biofilm</i> en presencia de cloruro de benzalconio	107
6.5.4. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la viabilidad de las células planctónicas	110
6.6. PERSISTENCIA AMBIENTAL DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN LA PLANTA	
B. RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA DESINFECCIÓN.	112
6.6.1. Subtipos de <i>L. monocytogenes</i> identificados en la Planta B	114
6.6.1.1. Serotipos moleculares y pulsotipos	114
6.6.1.2. Subtipos <i>inlA</i>	116
6.6.2. Susceptibilidad a antimicrobianos de los subtipos de la Planta B	116
6.6.2.1. Fenotipos de resistencia y susceptibilidad.....	116
6.6.2.2. Genotipos de resistencia a cloruro de benzalconio.....	117
6.6.3. Formación de <i>biofilm</i> en presencia de cloruro de benzalconio de los subtipos de la Planta B	118
6.6.4. Análisis de las secuencias genómicas de cinco aislados resistentes a cloruro de benzalconio.....	119
6.6.4.1. Características generales de las secuencias genómicas	119
6.6.4.2. Identificación in silico de subtipos basados en las secuencias de múltiples genes	119
6.6.4.3. Análisis comparativo de los genomas secuenciados	121
7. CONCLUSIONES.....	129
8. BIBLIOGRAFÍA	133
9. ANEXO	159

Tabla 1. Microorganismos de colección empleados.

Tabla 2. Cebadores empleados en las reacciones de amplificación o secuenciación de DNA.

Tabla 3. Composición de la masa de embutido elaborada para comparar el efecto de dos cultivos protectores sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Tabla 4. Prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y los productos de la Planta A.

Tabla 5. Numero de aislados de *L. monocytogenes* identificados a partir de muestras ambientales y de productos de la Planta A.

Tabla 6. Subtipos moleculares identificados en la Planta A.

Tabla 7. Evolución de los cuatro serotipos de *L. monocytogenes* en el modelo de fermentación de chorizo ibérico

Tabla 8. Características de las cepas tipo de los 29 pulsotipos identificados en la Planta A.

Tabla 9. Susceptibilidad *in vitro* de 29 cepas de *L. monocytogenes* a 12 antibióticos.

Tabla 10. Pulsotipos de *L. monocytogenes* “supervivientes”.

Tabla 11. Patrones de resistencia y susceptibilidad de los cuatro pulsotipos “supervivientes”.

Tabla 12. Características de las 13 cepas de *L. monocytogenes* de serotipo molecular 1/2a incluidas en los ensayos de formación de *biofilm*.

Tabla 13. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la formación de *biofilm*.

Tabla 14. Incidencia de los pulsotipos de *L. monocytogenes* detectados en el ambiente de la Planta B.

Tabla 15. Características más relevantes de los genomas secuenciados.

Tabla 16. Comparación por parejas de los genomas secuenciados.

Tabla 17. Polimorfismos y secuencias accesorias identificados en los genomas secuenciados.

Figura 1. Diagrama de las principales etapas de procesado en la Planta A.

Figura 2. Distribución de los aislados en función de su serotipo molecular.

Figura 3. Dendrograma de los 29 pulsotipos identificados en la Planta A.

Figura 4. Distribución de los aislados de los pulsotipos predominantes.

Figura 5. Evolución del pH y los recuentos de *L. monocytogenes* en el modelo de fermentación de chorizo ibérico.

Figura 6. Comparación de fenotipos de virulencia de *L. monocytogenes*.

Figura 7. Localización de la mutación detectada en la secuencia del gen *prfA* de las cepas S1 y S6.

Figura 8. Representación de la secuencia de la proteína InlA.

Figura 9. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la formación de *biofilm*.

Figura 10. Reducción de la viabilidad y del biofilm en presencia de cloruro de benzalconio.

Figura 11. Dendrograma de los 14 pulsotipos de serotipo molecular 1/2a identificados en las Plantas A y B.

Figura 12. Alineamiento múltiple de los genomas de *L. monocytogenes* S1, S10-1, S10-3, S2-2 y S2-3.

Figura 13. Porcentaje de regiones genómicas con función conocida encontradas en los genomas de las cepas de *L. monocytogenes*.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC, *ATP binding cassette* (dominio de unión a ATP).

BAC, *benzalkonium chloride* (cloruro de benzalconio).

BAC^R, resistente a cloruro de benzalconio.

BAC^S, sensible a cloruro de benzalconio.

BHI, *brain heart infusion* (infusión de cerebro y corazón).

Cd, cloruro de cadmio.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (Centros de Control y Prevención de Enfermedades de EE. UU.).

CDS, *coding sequence* (región codificante).

CEYM, *charcoal egg yolk medium* (medio con yema de huevo y carbón activado).

CFU, *colony forming units* (unidades formadoras de colonias).

CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos de EE. UU.).

CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente).

CTAB, *cetyl trimethyl ammonium bromide* (bromuro de cetiltrimetilamonio).

ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

EtBr, *ethidium bromide* (bromuro de etidio).

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos).

FDA, Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.).

HACCP, *hazard analysis and critical control points* (análisis de riesgos y de los puntos críticos de control).

LLO, *listeriolysin O* (listeriolisina O).

MDR, *multidrug resistance* (resistencia a múltiples fármacos).

MFS, *major facilitator superfamily* (superfamilia de los principales facilitadores [del transporte]).

MIC, *minimal inhibitory concentration* (concentración inhibitoria mínima).

MLST, *multilocus sequence typing* (identificación de subtipos basada en las secuencias de múltiples genes).

OD, *optical density* (densidad óptica [a una longitud de onda determinada, en nm]).

PC-PLC, *phosphatidylcholine phospholipase C* (fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina).

PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis* (electroforesis en gel en campo pulsante).

PI-PLC, *phosphatidylinositol phospholipase C* (fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol).

PMSC, *premature stop codon* (codón de parada prematuro).

QACs, *quaternary ammonium compounds* (compuestos de amonio cuaternario).

qPCR, *quantitative PCR* (PCR cuantitativa o a tiempo real).

RTE, *ready-to-eat* (listos-para-su-consumo).

SMR, *small multidrug resistance protein family* (familia de pequeños transportadores de múltiples fármacos).

SNP, *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de un nucleótido).

sTSYEB, *supplemented TSYEB* (TSYEB suplementado con glucosa y NaCl).

TSYEA, *tryptone soy yeast extract agar* (agar triptona de soja y extracto de levadura).

TSYEB, *tryptone soy yeast extract broth* (medio de triptona de soja y extracto de levadura).

USDA, United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de EE. UU.).

WGS, *whole-genome shotgun sequencing* (secuenciación al azar del genoma completo).

1. RESUMEN

La clasificación en subtipos moleculares de los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de productos cárnicos y del ambiente de las plantas de procesamiento donde se elaboran, habitualmente muestra la presencia de un reducido número de cepas y la persistencia durante largos periodos de tiempo de cepas específicas que sobreviven a la limpieza y la desinfección. Entre los mecanismos que facilitan la supervivencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos se incluyen la formación de *biofilm*, la adquisición de resistencia a antimicrobianos y la resistencia al estrés.

El objetivo inicial de esta tesis fue analizar los diferentes subtipos de *L. monocytogenes* que se encontraban contaminando el ambiente y los productos de una planta de sacrificio y elaboración de productos de cerdo ibérico (Planta A) durante un periodo de tres años, con el fin de identificar las rutas de contaminación y posibles patrones de persistencia. Mediante electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE) se identificaron 29 pulsotipos diferentes, ocho de los cuales se consideraron persistentes. La distribución en el ambiente y en los productos de tres pulsotipos predominantes generó patrones de contaminación específicos de cada uno de ellos, que mostraron respuestas diferentes ante las medidas correctoras que se adoptaron en la planta. Estos resultados destacan la importancia de la caracterización molecular de los subtipos de *L. monocytogenes* para identificar las rutas de contaminación específicas de la planta, que permitieron mejorar las estrategias de control de la contaminación.

Cuatro cepas de *L. monocytogenes* de diferente serotipo aisladas a partir de los productos procedentes de la Planta A, se emplearon para comparar la actividad antilisteria de dos cultivos bioprotectores (*L. sakei* CTC494 y BactofermTM F-LC) mediante un ensayo rápido que simulaba el inicio de la fermentación del chorizo ibérico. Una masa de embutido preparada a partir de carne fresca picada de cerdo ibérico, con o sin cultivo protector, se inoculó con *L. monocytogenes* y se incubó bajo dos condiciones diferentes para simular una fermentación tradicional lenta a baja temperatura (7 °C, un día) y una fermentación rápida a alta temperatura (20 °C, un día), seguida en ambos casos de un almacenamiento a 7 °C durante 13 días. BactofermTM F-LC ejerció un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, mientras que *Lactobacillus sakei* CTC494 mostró un efecto bactericida. *L. sakei* CTC494 podría considerarse, por tanto, un buen candidato para mejorar el control de *L. monocytogenes*

en la elaboración tradicional a baja temperatura de los embutidos ibéricos curados, empleado como cultivo protector o iniciador.

Los pulsotipos identificados en la Planta A fueron caracterizados mediante el análisis de diferentes factores de virulencia, la movilidad, la capacidad de adhesión y la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos. Al analizar la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos, dos cepas resultaron resistentes a cloruro de benzalconio (BAC^R) y las 29 cepas resultaron sensibles a un grupo de antibióticos empleados habitualmente por su actividad sobre bacterias Gram-positivas. Estos resultados demuestran que las cepas BAC^R de *L. monocytogenes* pueden no presentar resistencia cruzada a los antibióticos, y que en determinadas poblaciones de *L. monocytogenes* todavía es posible detectar una sensibilidad uniforme a los antibióticos.

Finalizados los tres años del estudio, el descenso en el aislamiento de *L. monocytogenes* durante un cuarto año de muestreos en la Planta A, vino acompañado de la identificación de solo cuatro de los 29 pulsotipos detectados previamente. La resistencia a BAC estaba asociada significativamente a la “supervivencia” prolongada de determinadas cepas en el ambiente de la Planta A, en la que los desinfectantes de amonio cuaternario (QACs) se emplearon con mayor frecuencia a partir del segundo año. Todos los pulsotipos “supervivientes” BAC^R pertenecían al serotipo molecular 1/2a. La selección de cepas de *L. monocytogenes* de serotipo 1/2a resistentes a concentraciones subletales de BAC más elevadas podría estar asociada con el aumento del empleo de los QACs en la planta.

Las cepas de serotipo molecular 1/2a detectadas en la Planta A, se seleccionaron para evaluar la influencia de concentraciones subinhibitorias de determinados biocidas y de la MIC de la cepa, sobre la formación de *biofilm* por *L. monocytogenes*. Las cepas BAC^R mostraron una formación de *biofilm* significativamente inferior que las cepas BAC^S en ausencia de BAC, independientemente de la tasa de crecimiento. En presencia de BAC, una de las cepas “supervivientes” BAC^R, portadora del determinante genético de resistencia a BAC Tn6188, formó *biofilm* a una concentración de BAC que impedía la formación de *biofilm* al resto de las cepas. La presencia de concentraciones subinhibitorias de BAC podría representar una ventaja para las cepas portadoras del transposón Tn6188, ya que compensaría el bajo nivel del *biofilm* asociado a su resistencia.

Las bases de la persistencia de *L. monocytogenes* se investigaron en una nueva planta de productos RTE (Planta B) en la que se procesaban productos frescos y curados procedentes de la Planta A. En la Planta B se identificaron cinco pulsotipos diferentes, dos de los cuales se habían detectado previamente en diferentes productos de la Planta A, indicando un probable origen de algunos de los subtipos de *L. monocytogenes* que colonizaron el ambiente de la Planta B. La secuenciación del genoma completo y el análisis MLST *in silico* de diferentes aislados BAC^R mostró importantes diferencias genómicas entre dos grupos de cepas: un mutante PrfA (tipo MLST ST31) y las cepas portadoras del Tn6188 (tipo MLST ST121). Ambos tipos se identificaron como contaminantes persistentes en la Planta A y posteriormente se detectaron en muestras ambientales procedentes de las superficies limpias y desinfectadas de la Planta B. La resistencia de bajo nivel a los desinfectantes detectada en ambos grupos de cepas, indica que en el ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos pueden seleccionarse subtipos resistentes y que dicha resistencia podría asociarse al fenotipo de persistencia.

Los resultados de este estudio proporcionan nuevos datos acerca de los mecanismos que permiten a *L. monocytogenes* sobrevivir en presencia de concentraciones subinhibitorias de uno de los tipos de desinfectantes más empleados en la industria alimentaria.

2. ABSTRACT

Different reports on molecular typing of *L. monocytogenes* from the environment and products of meat-processing plants indicate the presence of a limited number of strains or genotypes, together with the persistence of specific strains even after cleaning and disinfection procedures. Mechanisms that facilitate the survival of *L. monocytogenes* in food processing environments include biofilm formation, acquisition of antimicrobial resistance, and stress resistance.

The initial aim of this thesis was to track the different subtypes of *L. monocytogenes* that were contaminating the environment and products from an Iberian pig slaughterhouse and processing plant (Plant A) during a three-year period, to identify contamination routes and possible persistence patterns. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) restriction analysis allowed the identification of 29 different PFGE types, eight of them were considered persistent. Distribution of three dominant PFGE types in the environment and products generated specific contamination patterns of each PFGE type, which showed different response to corrective measures taken in the plant. The result highlighted that molecular subtyping methods can help identify plant-specific contamination routes for the implementation of improved control strategies

Four different strains of *L. monocytogenes* of different serotype isolated from pork products in Plant A were used to compare the antilisterial activity of two meat bioprotective cultures (*L. sakei* CTC494 y BactofermTM F-LC) by a rapid assay simulating the first stage of Iberian chorizo fermentation. Ground pork with or without protective cultures was inoculated with *L. monocytogenes* and incubated under two different conditions simulating the traditional, slow fermentation temperature (7 °C, 1 day) and a high, fast fermentation temperature (20 °C, 1 day), followed in both cases by storage at 7 °C for 13 days. Whereas BactofermTM F-LC exerted a bacteriostatic effect on the inoculated *L. monocytogenes*, *Lactobacillus sakei* CTC494 had a bactericidal effect. Thus, *L. sakei* CTC494 can be considered a good candidate for enhancing the control of *L. monocytogenes* in the low temperature processing of Iberian dry-cured sausages, acting both as bioprotective and starter culture.

PFGE types identified in Plant A, were characterized by assessing their potential virulence, and using motility, surface attachment, and antimicrobial susceptibility tests. Susceptibility testing to antimicrobial agents resulted in two strains resistant to benzalkonium chloride (BAC^R), and all 29 strains susceptible to a subset of commonly prescribed antibiotics active against Gram-positive bacteria. These results demonstrated

that BAC^R *L. monocytogenes* might not show cross-resistance to antibiotics, and showed that natural uniform sensitivity to antibiotics can still be found in certain highly related populations of *L. monocytogenes* from specific food-processing environments.

After the three-year study, the decrease in *L. monocytogenes* isolation during the fourth year of samplings in Plant A was accompanied by recovery of only four of the 29 previous PFGE types. BAC resistance resulted significantly associated with prolonged “survival” of specific strains in the processing environment of Plant A, where quaternary ammonium compounds (QACs) were used more frequently after the second year. All “surviving” and BAC^R PFGE types belonged to molecular serotype 1/2a. Selection of *L. monocytogenes* strains of molecular serotype 1/2a that were resistant to increased sublethal concentrations of BAC may be associated with an increase in the use of QACs in the plant.

All serotype 1/2a PFGE types detected in Plant A, were selected to evaluate the influence of both subminimal inhibitory concentrations of biocides and the MIC values of the strain on biofilm formation by *L. monocytogenes*. BAC^R strains produced significantly less biofilm than BAC^S strains in the absence of BAC, independent of the rate of planktonic growth. In presence of BAC, one “surviving” BAC^R strain harboring the genetic determinant of BAC resistance Tn6188, was able to form biofilm at a concentration of BAC which prevented biofilm formation among the rest of the strains. For BAC^R strains harboring Tn6188, subinhibitory BAC may represent an advantage, compensating for the weak biofilm formation level that might be associated with resistance.

The basis of persistence of *L. monocytogenes* was investigated in a newly constructed RTE Iberian pork processing facility (plant B) which received fresh and cured products from Plant A. Five different PFGE types were identified in plant B, two of them had been previously detected in different products in Plant A, indicating a possible origin of certain *L. monocytogenes* PFGE types which colonized Plant B. Whole-genome sequencing and *in silico* multilocus sequence typing (MLST) analysis of different BAC^R isolates showed that large genomic differences existed between two groups of resistant *L. monocytogenes* strains: a PrfA mutant (MLST type ST31) and the strains containing Tn6188 (type ST121). Both types were identified as persistent contaminants in the Plant A and subsequently were detected in Plant B in environmental samples obtained from clean and disinfected surfaces. The low-level resistance to disinfectants detected in both

groups of strains indicated that resistant subtypes can be selected for in food processing environments and that resistance can be associated to the persistent phenotype.

The results of this study provide new data on the mechanisms through which *L. monocytogenes* can survive in the presence of subinhibitory concentrations of a class of disinfectants that are extensively used in the food industry.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

3.1.1. Taxonomía y características del género *Listeria*

Listeria monocytogenes es una especie bacteriana perteneciente al género *Listeria*, un grupo de bacilos Gram-positivos del filo *Firmicutes*, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, sin cápsula, móviles a temperaturas entre 10-25 °C y con un bajo contenido de G+C en su DNA (Velge y Roche 2010).

El género *Listeria* incluye en la actualidad más de 15 especies, y el clado *Listeria sensu stricto* lo forman seis especies, entre las que se encuentran las únicas patógenas (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*) (den Bakker et al. 2014, Weller et al. 2015). Las especies y los subtipos de *Listeria* tienen distintas preferencias ecológicas, por lo que la detección de *Listeria* spp. no es un buen indicador de la posible presencia de *L. monocytogenes* (Sauders et al. 2012).

Listeria spp. es capaz de sobrevivir, e incluso crecer, en condiciones muy adversas. Aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C y su valor de pH óptimo 7, es capaz de crecer en un amplio rango de temperatura (entre 1 y 45 °C) y pH (entre 4.5 y 9.2). Puede crecer con concentraciones de NaCl hasta del 10%, y sobrevivir en concentraciones superiores (si bien, su supervivencia en condiciones de pH bajo y concentraciones elevadas de sal depende fundamentalmente de la temperatura), y es capaz de crecer con valores de actividad de agua inferiores a 0.93 (Rocourt y Buchrieser 2007).

L. monocytogenes se identificó por primera vez en 1926 por Murray et al., quienes la denominaron *Bacterium monocytogenes* tras observar la monocitosis que provocaba en un grupo de conejos, y en 1940, Pirie et al. designaron al microorganismo con su nombre actual. Desde la identificación del patógeno aparecen documentadas diversas manifestaciones de infecciones causadas por *L. monocytogenes* en animales y humanos. Pero es en una fecha tan tardía como 1981 cuando se asocia por primera vez la enfermedad infecciosa causada por *L. monocytogenes* con el consumo de alimentos. Este primer brote de listeriosis alimentaria ocurrió en Nueva Escocia (Canadá), afectó a 41 personas, de las que 18 murieron, y finalmente se asoció al consumo de ensalada de col contaminada (Schlech et al. 1983).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua en la naturaleza. Puede encontrarse en suelos, plantas, aguas, ensilados, aguas residuales, residuos de mataderos, leche procedente de

animales sanos o con mastitis, heces humanas o animales, y se aísla del ganado vacuno, ovino o caprino, aves de corral y también, aunque raramente, de animales salvajes (Farber y Peterkin 1991). Su amplia distribución en la naturaleza y resistencia a condiciones ambientales adversas, que le permiten sobrevivir a numerosas tecnologías del procesamiento de alimentos y multiplicarse durante el almacenamiento de determinados alimentos, hacen que la exposición de los humanos a *L. monocytogenes* sea relativamente frecuente.

3.1.2. La listeriosis

L. monocytogenes es el agente causal de la listeriosis humana, cuya principal ruta de transmisión es el consumo de alimentos contaminados (Schwartz *et al.* 1988, Mead *et al.* 1999). La enfermedad puede manifestarse en forma de listeriosis gastrointestinal no invasora o en forma de listeriosis invasora, dependiendo del estado inmunológico del hospedador, el potencial patogénico de la cepa de *L. monocytogenes* y la dosis infecciosa. En individuos sanos, la enfermedad no invasora causada por *L. monocytogenes* generalmente se limita a una gastroenteritis febril. En individuos inmunocomprometidos, como ancianos o pacientes sometidos a tratamiento con inmunosupresores, la bacteria es capaz de causar infecciones sistémicas como septicemia, meningitis, encefalitis y, en el caso de mujeres embarazadas, infección del feto que puede desembocar en aborto, muerte del mismo o infecciones neonatales (Velge y Roche 2010, Goulet *et al.* 2012).

Pese a la amplia exposición al patógeno, es una enfermedad poco frecuente que se presenta como casos aislados o como pequeños brotes con un reducido número de casos, y, ocasionalmente, como grandes brotes epidémicos, con una incidencia que varía entre 0.1 y 1 casos esporádicos / 100000 personas y año (Hernandez-Milian *et al.* 2014). En Europa se ha observado una tendencia creciente (estadísticamente significativa) entre 2009 y 2013, con 1763 casos de listeriosis humana confirmados en 2013. La incidencia global de la enfermedad, de 0.44 casos / 100000 personas, supone un incremento del 8.6% comparado con 2012. Estos casos de listeriosis provocaron 191 fallecimientos, que representan un porcentaje de mortalidad del 15.6% (EFSA y ECDC 2015).

3.1.3. Patogenicidad de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es un parásito intracelular capaz de invadir y replicarse tanto en células epiteliales como en macrófagos, que entra en el hospedador de forma primaria a través del intestino, tras lo cual se disemina gracias a su capacidad de atravesar la barrera intestinal, placentaria y hematoencefálica.

Ciclo infeccioso de L. monocytogenes y principales factores de virulencia

Un gran número de factores de virulencia están involucrados en cada uno de los pasos clave del ciclo infeccioso de *L. monocytogenes* (Pizarro-Cerdá *et al.* 2012), que comienza con la adhesión de la bacteria a la superficie de la célula eucariota y la subsiguiente penetración mediante fagocitosis.

La entrada de *L. monocytogenes* es inducida por la acción de las internalinas, proteínas de superficie de la bacteria que se unen a diversos receptores de la célula hospedadora, entre las cuales InlA e InlB son las más importantes y mejor caracterizadas. InlA (codificada por el gen *inlA*) se une al receptor específico E-caderina para penetrar en las células que expresan dicha proteína, como las células del epitelio intestinal, mientras que InlB (codificada por el gen *inlB*) reacciona con los receptores celulares Met y C1q-R, lo que permite la internalización de *L. monocytogenes* en hepatocitos, fibroblastos y células epiteliales (Liu *et al.* 2007). Otras proteínas de superficie implicadas en la adhesión y/o entrada de *L. monocytogenes* a la célula eucariota son las autolisinas Ami, p60 y Auto (Cabanés *et al.* 2004, Asano *et al.* 2011), Vip, FbpA, Lap, LapB, y algunas de las proteínas que intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular, como ActA y la hemolisina o listeriolisina O (LLO).

Tras su entrada en la célula eucariota, la capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes* depende de su habilidad para lisar la membrana de la vacuola fagocítica que la engloba. Para ello, *L. monocytogenes* secreta en el interior de la vacuola la hemolisina LLO, y dos fosfolipasas C. La hemolisina LLO (codificada por el gen *hly*) pertenece a la familia de las citolisinas dependientes de colesterol y su actividad, óptima al pH ácido del fagosoma, es necesaria para la liberación de *L. monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora (Schnupf *et al.* 2007). La acción sinérgica de las dos fosfolipasas refuerza la acción de la hemolisina. PI-PLC (codificada por el gen *plcA*) tiene un sustrato específico, el fosfatidilinositol, y PC-PLC (codificada por el gen *plcB*) tiene un rango más amplio de sustrato y es activada por la metaloproteasa Mpl (codificada por el gen *mpl*) (Vázquez-Boland *et al.* 2001).

Una vez en el citoplasma, *L. monocytogenes* inicia una rápida replicación intracelular y se desplaza en el interior de la célula hospedadora. Ese movimiento intracelular y la diseminación a la célula colindante se ven favorecidos por la proteína de membrana ActA (codificada por el gen *actA*) que dirige el ensamblaje de monómeros de actina para dar lugar a filamentos que impulsan a la bacteria desde el citoplasma hacia las células vecinas (Pizarro-Cerdá y Cossart 2006). Al entrar en contacto con la membrana plasmática de la célula infectada, se forma una protuberancia hacia la célula colindante en la que *L. monocytogenes* queda envuelta. Esta estructura invasora es fagocitada, dando lugar a una vacuola secundaria de doble membrana. Con la lisis de esa vacuola fagocítica de doble membrana por la acción de LLO, en la que la lecitinasa PC-PLC juega también un papel relevante, se inicia un nuevo ciclo de infección.

Los genes de virulencia de *Listeria* se organizan dentro de regiones del cromosoma, conocidas como islas de patogenicidad. Estas regiones son adquiridas por la bacteria a través de mecanismos de transferencia genética horizontal (a veces como parte de un elemento genético móvil), por lo cual son importantes en la evolución bacteriana (Vázquez-Boland *et al.* 2001).

Los genes que codifican para seis de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*) se encuentran situados en una región del cromosoma de 9,2 kb llamada Isla 1 de Patogenicidad de *Listeria* (LIPI-1, *Listeria Pathogenicity Island 1*) o agrupamiento de genes de virulencia (*virulence gene cluster*). La expresión de los genes de virulencia que forman parte de la LIPI-1 se regula por el producto del primer gen, la proteína reguladora PrfA, una proteína de 27 kDa codificada por el primero de los genes, *prfA*. La expresión de los genes *inlA* e *inlB*, situados en otra zona del cromosoma, es también regulada de forma parcial por PrfA (Dussurget *et al.* 2004).

El factor sigma alternativo σ^B , codificado por el gen *sigB*, regulador de la expresión de genes de respuesta al estrés, modula también en colaboración con PrfA la transcripción de genes de virulencia. Este factor está implicado en la regulación parcial de los genes *inlA* e *inlB* (Kim *et al.* 2005), y desempeña una doble labor como activador inicial de la transcripción de *prfA* (durante la fase gastrointestinal de la infección) y como represor del regulón PrfA durante la infección intracelular (Ollinger *et al.* 2009).

En algunas cepas de *L. monocytogenes* se ha identificado un nuevo factor de virulencia localizado en la Isla 3 de Patogenicidad de *Listeria* (LPI-3). Se trata de la listeriolisina S, codificada por el gen *lfs* (Cotter *et al.* 2008).

Variabilidad de la virulencia de L. monocytogenes

Los datos experimentales revelan una gran variación en los niveles de virulencia y patogenicidad de los diferentes serotipos y cepas de *L. monocytogenes*. Mientras que algunas cepas epidémicas son muy infectivas y en ocasiones mortales, existen otras (especialmente las aisladas a partir de los alimentos y el ambiente) que al ser estudiadas mediante ensayos *in vitro*, cultivos celulares o modelos animales, muestran una virulencia atenuada o son totalmente avirulentas (Jensen *et al.* 2008, Neves *et al.* 2008b, López *et al.* 2013).

Diversas proteínas secretadas por *L. monocytogenes* como la hemolisina LLO, las fosfolipasas, y las internalinas InlA e InlB, son de especial importancia para la virulencia y patogenicidad. Las cepas de *L. monocytogenes* con mutaciones en alguno/os de los genes que codifican estas proteínas, con frecuencia dan lugar a proteínas no funcionales o truncadas, lo que se traduce en una atenuación de la virulencia (Velge y Roche 2010).

Las variaciones en la actividad LLO, PC-PLC o PI-PLC, detectadas mediante la adición de sangre de cordero, yema de huevo o inositol a los medios de cultivo, y el empleo de medios cromogénicos, permiten observar fácilmente la ausencia o disminución de estos factores de virulencia en determinados aislados o cepas de *L. monocytogenes*, si bien, la expresión en condiciones intracelulares de determinados genes de virulencia puede diferir de la observada extracelularmente. La presencia de carbón activo en el medio de cultivo, por ejemplo, se puede relacionar con un aumento de la actividad hemolítica y lecitinasa. También se ha observado la influencia de diversos factores ambientales, como la temperatura o la concentración de NaCl, sobre la actividad lecitinasa (Ermolaeva *et al.* 2003, Roberts *et al.* 2005). Por otro lado, estas proteínas pueden ser producidas tanto por cepas virulentas como por cepas avirulentas (Roche *et al.* 2009).

Se conocen dos polimorfismos en el gen *prfA* asociados con fenotipos de virulencia atenuada (Roche *et al.* 2005). Uno de los polimorfismos consiste en una inserción de siete nucleótidos (CAGGAGT) tras el codón 171 de *prfA* que provoca un cambio en la fase de lectura desde el codón 174 e introduce un codón de parada en la posición 178, lo

que origina una proteína PrfA troncada. El otro polimorfismo consiste en una sustitución de bases (A por G) en el codón 220, lo que provoca una sustitución de aminoácidos (lisina por treonina) e impide que la proteína resultante de la mutación se una eficientemente a la secuencia diana específica de PrfA, la caja PrfA, en la región promotora de los genes activados por PrfA (Velge *et al.* 2007).

Las cepas de *L. monocytogenes* con codones de parada prematuros en el gen *inlA* muestran fenotipos de virulencia atenuada en modelos animales y una menor capacidad de invasión en ensayos con células epiteliales humanas, lo que permite relacionar dichas cepas de *L. monocytogenes* con una reducción significativa de la virulencia (Nightingale *et al.* 2005 y 2008, Roldgaard *et al.* 2009, López *et al.* 2013). Se conocen al menos 18 polimorfismos diferentes en el gen *inlA*, que provocan codones de parada prematuros y dan lugar a la expresión de formas no funcionales de la proteína InlA (Van Stelten *et al.* 2010).

La mayor parte de los casos de listeriosis humana se deben a cepas pertenecientes a tres de los 13 serotipos identificados en *L. monocytogenes*, los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (Orsi *et al.* 2011, EFSA 2015). El desarrollo de las técnicas genotípicas de identificación de subtipos y los estudios de genética de poblaciones, se encaminan a la caracterización de los aislados de *L. monocytogenes* y su agrupamiento en *clusters* o linajes asociados con la enfermedad humana y animal. El análisis filogenético de múltiples genes agrupa las cepas de *L. monocytogenes* en cuatro grandes grupos genéticos denominados linajes I, II, III y IV. La mayoría de los aislados de *L. monocytogenes* pertenecen al linaje I (que incluye los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e) y al linaje II (que incluye los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c), por lo que esta clasificación filogenética sitúa los tres principales serotipos asociados con la listeriosis humana (1/2a, 1/2b y 4b) en dos linajes diferentes. Las cepas del linaje III (que incluye los serotipos 4a, 4c y algunas cepas atípicas de serotipo 4b) y las del linaje IV, son cepas poco frecuentes y con caracteres especiales que mayoritariamente se aíslan en animales con síntomas clínicos (Orsi *et al.* 2011).

La mayoría de los brotes y numerosos casos esporádicos de listeriosis están relacionados con cepas de serotipo 4b, perteneciente al linaje I. Las cepas del linaje II se aíslan generalmente con mayor frecuencia a partir de los alimentos o el ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos que las del linaje I (Orsi *et al.* 2011). Esa aparente mayor representación de cepas de linaje II entre las cepas procedentes de los alimentos

y del ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos puede deberse a una mayor capacidad de dichas cepas para crecer y sobrevivir en dichos ecosistemas, o a una ventaja para competir durante los procesos de enriquecimiento empleados para su aislamiento (Bruhn *et al.* 2005), o a una mayor resistencia a las bacteriocinas producidas por organismos habitualmente presentes en los alimentos (Buncic *et al.* 2001).

La mayor prevalencia de las cepas de linaje I entre las responsables de los casos de listeriosis humana no puede atribuirse, por tanto, a su mayor presencia en los alimentos. Numerosos estudios sugieren que los linajes I y II incluyen grupos clonales y subtipos con diferentes grados de virulencia (Nightingale *et al.* 2006), y que el linaje II en particular incluye una considerable proporción de aislados (más del 30%) que presentan una virulencia atenuada debido a la presencia de codones de parada prematuros en el gen *inlA* (Orsi *et al.* 2011). La mayor representación de cepas de *L. monocytogenes* del linaje I entre los casos de listeriosis humana puede deberse a la reducción de la virulencia mostrada por un gran número de cepas del linaje II, que provocaría una menor representación de este linaje entre las cepas de origen clínico. Esta hipótesis concuerda con la escasa representación de cepas de serotipo 1/2c observada entre los casos clínicos con respecto a su presencia en los alimentos. La mayoría, si no todas, las cepas de serotipo 1/2c presentan codones de parada prematuros en *inlA* (Jacquet *et al.* 2004, Tamburro *et al.* 2010). Dentro del linaje I, se encuentran codones de parada prematuros en el gen *inlA* de cepas de serotipo 1/2b y 3b, mientras que las cepas de serotipo 4b siempre expresan la proteína InlA completa, lo que explicaría la presencia mayoritaria de cepas de serotipo 4b entre los casos de listeriosis humana (Jacquet *et al.* 2004, Ward *et al.* 2010).

3.2. *L. MONOCYTOGENES* EN LOS ALIMENTOS Y EN EL AMBIENTE DE LAS PLANTAS DE PROCESADO DE ALIMENTOS

3.2.1. Presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos

En los últimos años, en los que se han modificado notablemente los hábitos alimenticios, ha aumentado la demanda de alimentos frescos mínimamente procesados, con menor contenido de conservantes químicos y una prolongada vida útil, que necesitan conservarse en refrigeración. La mayor parte de los casos de listeriosis humana parecen ser causados por alimentos RTE contaminados por *L. monocytogenes*, a

una concentración elevada en el momento de su consumo (CFSAN FSIS 2003, EFSA 2013).

La presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos RTE puede deberse al “procesado mínimo”, que no elimina al patógeno totalmente. Para evitarlo, cada vez es más frecuente el empleo de varios tratamientos subletales que pueden resultar tan eficaces como un único tratamiento de mayor intensidad, si bien, se corre el riesgo de inducir en las bacterias mecanismos de tolerancia adquirida que incrementen su supervivencia frente a futuras exposiciones a esos u otros tratamientos (Hill *et al.* 2002, Navas *et al.* 2006, Gandhi y Chikindas 2007).

En otras ocasiones, las operaciones posteriores al procesado pueden ser causa de contaminación cruzada y el alimento puede servir como vector de diseminación del patógeno (Tompkin 2002, Lin *et al.* 2006). Se han identificado cepas persistentes de *L. monocytogenes* como principales responsables de la contaminación de los productos RTE tras su procesado, y algunos brotes de listeriosis se han asociado a la contaminación persistente del ambiente de las plantas de procesado (Orsi *et al.* 2008, Malley *et al.* 2015).

Tras el primer brote alimentario de listeriosis detectado en Canadá en 1981, varios brotes de listeriosis humana con un elevado índice de mortalidad se han debido a productos cárnicos RTE, como salchichas y otros productos elaborados (Kathariou *et al.* 2006, Gilmour *et al.* 2008). Otros alimentos RTE implicados con frecuencia en brotes de listeriosis son los productos lácteos, como leche pasteurizada (CDC 2008) o una amplia variedad de quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada (Bille *et al.* 2006, Fretz *et al.* 2010, Jackson *et al.* 2011, Gaulin *et al.* 2012), pescados, particularmente ahumados (Ericson *et al.* 1997, Tham *et al.* 2000), frutas (CDC 2011) y sándwiches (Shetty *et al.* 2009).

Ante el riesgo asociado a este tipo de productos, los gobiernos y agencias alimentarias internacionales establecen unos criterios de seguridad alimentaria que regulan los límites aceptables respecto a la presencia de *L. monocytogenes* en los productos RTE. En el caso de EE.UU. se aplica la política de “tolerancia cero”, que implica la retirada del mercado de aquellos productos RTE con niveles detectables de *L. monocytogenes* (≥ 1 CFU/25 g de muestra).

En la Unión Europea el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, modificado por los Reglamentos nº 1441/2007 y nº 365/2010, regula los criterios de seguridad alimentaria respecto a *L. monocytogenes* de los productos RTE, y establece tres categorías de alimentos. La primera categoría, a la que se aplica el criterio de “ausencia en 25 g”, engloba los alimentos RTE destinados a lactantes y los destinados a usos médicos especiales. En la segunda categoría, que engloba los alimentos RTE en los que *L. monocytogenes* puede multiplicarse, el límite se establece de acuerdo con la fase en la que se aplica el criterio: antes de que el alimento deje de estar bajo el control inmediato del explotador de la empresa que lo ha producido, se aplica el criterio de “ausencia en 25 g”, mientras que en la fase de comercialización se aplica un límite de 100 CFU/g. La tercera categoría, a la que se aplica un límite de 100 CFU/g, incluye el resto de alimentos RTE.

Según el informe anual elaborado en el año 2015 por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) y el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*) (EFSA y ECDC 2015), ninguna muestra de productos destinados a lactantes y usos médicos especiales superaba el límite legal de seguridad alimentaria mencionado. Como en años anteriores, la categoría de alimentos con la mayor proporción de productos RTE que superaban los límites legales correspondía a pescados, mayoritariamente ahumados (con un 10.8% de muestras positivas, de las cuales un 1.6% incumplían los criterios legales), seguida de los quesos frescos y semicurados elaborados con leche cruda o tratada a baja temperatura (con un 4.3% muestras positivas, de las cuales un 0.6% incumplía los criterios de tolerancia) y los productos cárnicos RTE, en los que la mayor proporción de muestras positivas (3.4%) correspondía a productos de cerdo, aunque la mayor proporción que excedía los límites legales (1%) correspondía a productos avícolas (EFSA y ECDC 2015).

3.2.2. Rutas de contaminación y persistencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de las plantas de procesado de alimentos

La amplia distribución de *L. monocytogenes* en la naturaleza convierte a las materias primas, aditivos, agua, personas, animales y equipos en fuentes potenciales de contaminación de las plantas de procesado de alimentos.

Las materias primas pueden ser la fuente inicial de la contaminación de las plantas de procesado y también pueden ser la causa de la contaminación de los productos

elaborados a partir de ellas (Markkula *et al.* 2005, López *et al.* 2007, Dass *et al.* 2010). Sin embargo, la presencia habitual en los productos finales de cepas de *L. monocytogenes* diferentes a las cepas de las materias primas indica que la contaminación tiene lugar principalmente durante el procesado y se debe fundamentalmente a cepas del ambiente y los equipos de procesado (Von Laer *et al.* 2009, Chen *et al.* 2010). La identificación de las mismas cepas en los productos finales y las máquinas e instalaciones empleadas durante su procesado, como cortadoras, picadoras, saladoras, loncheadoras, envasadoras, cintas transportadoras y cámaras de refrigeración o congelación, indica que dichas máquinas o instalaciones juegan un papel importante en la contaminación por *L. monocytogenes* (Lundén *et al.* 2002, Lundén *et al.* 2003b, Keto-Timonen *et al.* 2007, Bērziņš *et al.* 2010).

Para evitar la presencia de *L. monocytogenes* en los productos finales, se debe evitar también la contaminación cruzada entre las zonas donde se manipulan los productos crudos y los procesados mediante medidas como la compartimentalización de las líneas de procesado y, en concreto, la separación de las áreas donde se manipulan los alimentos ya procesados (Lundén *et al.* 2003b).

En la UE, el Reglamento Comunitario 853/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios, contempla en su artículo 5 la obligatoriedad que tienen los operadores de las empresas alimentarias de aplicar y mantener un sistema de autocontrol basado en los principios del “Análisis de Riesgos y de los Puntos Críticos de Control” (HACCP, *hazard analysis and critical control point*) (DOUE 2004). Pese a estas medidas de control, es prácticamente imposible erradicar *L. monocytogenes* del ambiente de las plantas de procesado, donde determinadas cepas son capaces de sobrevivir y colonizar multitud de equipos (máquinas, mesas, cuchillos...) e instalaciones (desagües, suelos, paredes...) persistiendo en el ambiente durante largos periodos de tiempo (Miettinen *et al.* 1999, Kabuki *et al.* 2004, Lappi *et al.* 2004, Olsen *et al.* 2005, López *et al.* 2008, Ferreira *et al.* 2011). Debido a la gravedad de este problema, y de acuerdo con el Reglamento CE 2073/2005, la toma de muestras para detectar *L. monocytogenes* en el ambiente y equipos de procesado de alimentos es obligatoria.

En ocasiones, la misma cepa de *L. monocytogenes* se ha identificado en diferentes plantas de procesado, lo que indica la existencia de clones dispersos geográficamente (Chasseigneaux *et al.* 2001, Peccio *et al.* 2003, Thevenot *et al.* 2006b), aunque, en general, las cepas aisladas en diferentes plantas de procesado son diferentes y el

ambiente de cada planta de procesamiento suele ser colonizado por un número limitado de cepas específicas (Gudmundsdóttir *et al.* 2005, Fugget *et al.* 2007, Verghese *et al.* 2011).

3.2.3. Factores asociados a la persistencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos

Las cepas de *L. monocytogenes* presentan diferente capacidad para persistir en el ambiente de las plantas de procesamiento (Holah *et al.* 2002, Lundén *et al.* 2003b, Keto-Timonen *et al.* 2007, López *et al.* 2008), si bien, las causas que determinan dicha diferencia no están claras (Carpentier y Cerf 2011, Ferreira *et al.* 2014). Algunos autores afirman que los aislados representantes de subtipos persistentes presentan características específicas que favorecen su persistencia (Fox *et al.* 2011, Verghese *et al.* 2011); otros, en cambio, no han encontrado evidencia de tales características (Holch *et al.* 2013, Stasiewicz *et al.* 2015), en cuyo caso, la persistencia podría considerarse fundamentalmente un proceso aleatorio y la mayoría de las cepas de *L. monocytogenes* podrían llegar a ser persistentes si se encuentran en el lugar apropiado en el momento oportuno (Ferreira *et al.* 2011).

La persistencia de determinadas cepas de *L. monocytogenes* tras las operaciones de limpieza y desinfección, indica que la persistencia debe estar relacionada con factores asociados a la supervivencia a dichos procesos, como la existencia de zonas de difícil acceso para su limpieza, la formación de *biofilms* y/o la resistencia a los desinfectantes.

La compleja estructura de las líneas de procesamiento y/o el mal diseño de la maquinaria, impiden con frecuencia que las operaciones de limpieza y desinfección alcancen algunas zonas contaminadas. Las bacterias, transportadas por los líquidos o aerosoles generados durante el procesamiento o durante las tareas de limpieza (mediante, por ejemplo, el cepillado ó la limpieza con mangueras o pistolas de alta presión), pueden alcanzar estas zonas de difícil acceso, donde se acumulan junto con el agua y restos de materia orgánica. Esto provoca la formación de nichos o reservorios en los que la bacteria, protegida contra los desinfectantes y en condiciones de humedad y nutrientes adecuadas, puede sobrevivir y multiplicarse (Carpentier y Cerf 2011).

L. monocytogenes es capaz de adherirse a las superficies y formar *biofilms*, cuya estructura puede variar desde simples agregados de células hasta estructuras tridimensionales más complejas en las que las bacterias aparecen entrelazadas mediante

material extracelular (Renier *et al.* 2011). En este estado, las células de *L. monocytogenes* son más resistentes al estrés y a los tratamientos de limpieza y desinfección que las células en suspensión (Pan *et al.* 2006), lo que podría facilitar la supervivencia de determinadas cepas de *L. monocytogenes* y explicar su persistencia durante largos periodos de tiempo, incluso años, en una planta de procesado (Møretrø y Langsrud 2004, Renier *et al.* 2011).

En diversas ocasiones, se ha observado que las cepas persistentes producen más *biofilm* que las cepas esporádicas (Borucki *et al.* 2003, Verghese *et al.* 2011, Nakamura *et al.* 2013, Ochiai *et al.* 2014), mientras que en otras no se ha identificado tal correlación (Djordjevic *et al.* 2002, Harvey *et al.* 2007, Jensen *et al.* 2007, Nilsson *et al.* 2011). Esa falta de correlación podría atribuirse a diferentes factores, entre ellos determinadas características específicas de las cepas o las condiciones experimentales empleadas en cada estudio (Folsom *et al.* 2006, Pan *et al.* 2010, Nilsson *et al.* 2011).

La movilidad, por ejemplo, es una característica variable en *L. monocytogenes* que puede influir en la adhesión a las superficies y la formación de *biofilm* (Renier *et al.* 2011). También se ha observado una relación entre la capacidad de adhesión y formación de *biofilm*, y las principales divisiones filogenéticas o linajes en que se agrupan las cepas de *L. monocytogenes*. Diversos autores afirman que las cepas de serotipo 1/2a producen más *biofilm* que las de otros serotipos (Borucki *et al.* 2003, Pan *et al.* 2010, Nilsson *et al.* 2011). Ese aumento en la producción de material extracelular podría contribuir a la supervivencia de las cepas de serotipo 1/2a, al conferirles una mayor resistencia al estrés subletal al que las bacterias se ven sometidas en el procesado de alimentos y, en parte, podría justificar la mayor presencia de cepas de serotipo 1/2a en los alimentos y el ambiente de las plantas de procesado frente a las de serotipo 4b.

Los estudios de formación de *biofilm* de múltiples especies también indican que la interacción de *L. monocytogenes* con otros organismos es muy compleja, pudiendo afectar tanto positiva como negativamente a la colonización de superficies (Fox *et al.* 2014, Da Silva Fernandes *et al.* 2015).

En los ensayos *in vitro*, *L. monocytogenes* se elimina de forma eficiente con disoluciones a las concentraciones de uso real de la mayoría de los desinfectantes. En las plantas de procesado, en cambio, la presencia de *biofilms* y otros factores, como una limpieza insuficiente antes de la desinfección, la humedad excesiva de algunas superficies, el aclarado insuficiente tras la desinfección y/o el uso de dosis inadecuadas

de los productos, pueden reducir significativamente la eficacia de los desinfectantes. En esas condiciones, la exposición regular de las bacterias a concentraciones subletales de desinfectante puede desembocar, por presión selectiva, en la adquisición de genes de resistencia o la adaptación fenotípica de bacterias inicialmente susceptibles.

La resistencia a los desinfectantes en las células sésiles (*biofilms*) y en las células planctónicas (libres) son fenómenos claramente diferentes (Kastbjerg y Gram 2009, Pan *et al.* 2006, Stopforth *et al.* 2002). En el caso de las células planctónicas, la resistencia depende de atributos intrínsecos de las células tales como la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la cepa. En unos pocos casos se han descrito MICs elevadas de desinfectantes en cepas de *L. monocytogenes* persistentes en el ambiente de diferentes cadenas de producción de alimentos (Aase *et al.* 2000, Lundén *et al.* 2003a, Fox *et al.* 2011, Müller *et al.* 2013). En el caso de las células sésiles, la resistencia depende de atributos del propio *biofilm* tales como la limitación que representa la matriz extracelular para la difusión de los desinfectantes (Pan *et al.* 2006, Bridier *et al.* 2011, Lourenço *et al.* 2011, Nilsson *et al.* 2011).

Entre los desinfectantes que se emplean usualmente en las industrias alimentarias se incluyen alcoholes, aldehídos, ácido paracético, hipoclorito sódico, compuestos organoclorados y surfactantes (entre los que se incluyen los compuestos derivados del amonio cuaternario y las bisguanidas) (McDonell y Russell 1999, Holah *et al.* 2002).

La resistencia a los desinfectantes basados en compuestos de amonio cuaternario (QACs, *quaternary ammonium compounds*), como el cloruro de benzalconio (BAC, *benzalkonium chloride*), puede ser un factor especialmente relevante en la adaptación de *L. monocytogenes* al ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos, en las que dichos compuestos se emplean de forma extensiva. La mayor resistencia al BAC observada en cepas aisladas tras la desinfección que en cepas de laboratorio, indica que la presión selectiva ejercida por el uso/mal uso de los QACs puede ser el origen de la resistencia a dichos compuestos (Sidhu *et al.* 2002, Hegstad *et al.* 2010).

Mediante la MIC, definida como la menor concentración de un desinfectante que bajo unas condiciones *in vitro* previene el crecimiento de una bacteria en un periodo de tiempo definido (EUCAST 2000), se ha observado que la resistencia al BAC entre cepas de *L. monocytogenes* procedentes de alimentos o plantas de procesamiento puede variar entre el 10% (Aase *et al.* 2000) y casi el 50% (Mereghetti *et al.* 2000, Soumet

etal. 2005), y puede ser especialmente alta entre cepas de serotipo 1/2a (60%) (Mullapudi *et al.* 2008).

L. monocytogenes no es una especie particularmente resistente, ya que las cepas resistentes presentan valores de MICs de BAC en torno a 10 mg/l (Aase *et al.* 2000, Soumet *et al.* 2005, Romanova *et al.* 2006). La exposición a concentraciones subinhibitorias de QACs puede provocar un incremento de dos a cuatro veces en la MIC de *L. monocytogenes* (Kastbjerg y Gram 2012). Aunque los valores de esas cepas resistentes son sustancialmente inferiores a las concentraciones a las que los QACs se emplean en las plantas de procesado (≥ 500 -1000 mg/l) (Hegstad *et al.* 2010), esos bajos niveles de resistencia se han asociado con la persistencia ambiental de *L. monocytogenes* en diferentes cadenas de procesado de alimentos (Aase *et al.* 2000, Lundén *et al.* 2003a, Fox *et al.* 2011).

La exposición de las bacterias a concentraciones subinhibitorias de desinfectantes usados en la industria alimentaria y la consiguiente adaptación, puede aumentar su capacidad para formar *biofilms* y sobrevivir al tratamiento posterior con concentraciones elevadas de los mismos compuestos (Capita *et al.* 2014). Además, los desinfectantes pueden afectar a la cinética del crecimiento bacteriano, a la hidrofobicidad de la superficie celular, y a la morfología y ultraestructura, que son factores directamente relacionados con la adhesión a las superficies y la formación de *biofilm* (Capita *et al.* 2014).

La estimulación de la formación de *biofilm* tras la exposición a dosis subinhibitorias de BAC se puede observar en diferentes especies bacterianas (Drenkard y Ausbel 2002, Qu *et al.* 2010, Machado *et al.* 2012, Pagedar *et al.* 2012). El mismo fenómeno se puede observar también con desinfectantes alcohólicos (Milisavljevic *et al.* 2008) y con dióxido de cloro (Shemesh *et al.* 2010). En este último caso, el proceso es el resultado de un aumento de la transcripción de los principales operones responsables de la producción de la matriz extracelular, lo que sugiere que la estimulación de la formación de *biofilm* es una respuesta estable a la exposición a dosis subinhibitorias del desinfectante.

La presión selectiva ejercida por el uso de desinfectantes puede contribuir a la expresión y diseminación de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos, puesto que desinfectantes y antibióticos pueden compartir mecanismos de resistencia en las bacterias (Capita y Alonso-Calleja 2013). Por ejemplo, la resistencia a desinfectantes en

L. monocytogenes puede deberse a la sobreexpresión o adquisición de genes de bombas de flujo, como *bcrABC* (Dutta *et al.* 2013) o *qacH* (Muller *et al.* 2014), y algunas bombas pueden causar resistencia cruzada a distintos compuestos (Romanova *et al.* 2006). Estos genes de resistencia múltiple (MDR, *multidrug resistance*) podrían estar asociados con modificaciones de la producción de *biofilm*, ya que se ha visto que en *L. monocytogenes* existe un tipo de proteína MDR, en concreto un transportador de tipo ABC, relacionado con la formación de *biofilm* (Zhu *et al.* 2011).

En general, las cepas de *L. monocytogenes* son naturalmente susceptibles a la mayoría de los antimicrobianos activos frente a bacterias Gram-positivas, incluídos los que se utilizan para el tratamiento de la listeriosis humana y en veterinaria, con la excepción de cefalosporinas y fosfomicina (Gómez *et al.* 2014). El tipo de resistencia más frecuentemente observado entre los aislados de *L. monocytogenes* ha sido la resistencia a tetraciclina y otros compuestos del mismo grupo, como minociclina (Poyart-Salmeron *et al.* 1992, Charpentier y Courvalin 1999, Morvan *et al.* 2010) y doxiciclina (Vitas *et al.* 2007), probablemente debido al empleo extensivo de este grupo de antibióticos a nivel mundial, particularmente en alimentación animal (Charpentier *et al.* 1995). Entre los aislados de origen alimentario las cifras de resistencia a tetraciclinas y a fluoroquinolonas pueden ser elevadas (Lyon *et al.* 2008, Yan *et al.* 2010). Diversos estudios han mostrado la resistencia de determinadas cepas de *L. monocytogenes* a otros antimicrobianos, como eritromicina o trimetoprim (Facinelli *et al.* 1991, Charpentier *et al.* 1995, Granier *et al.* 2011).

3.2.4. *L. monocytogenes* en la industria cárnica porcina

Los numerosos análisis de las rutas de contaminación de *L. monocytogenes* en la industria porcina muestran la presencia de este patógeno en canales, carnes y productos elaborados, a lo largo de todas las etapas del procesado (Autio *et al.* 2004, Thévenot *et al.* 2006a, Farber *et al.* 2007, Kornacki y Gurtler 2007, Bērziņš *et al.* 2010).

Aunque el origen de la contaminación no está claro, estudios realizados en plantas de sacrificio y procesado de carne identifican las mismas cepas o genotipos de *L. monocytogenes* en muestras procedentes de amígdalas, contenido intestinal o vísceras de animales, canales y carne cruda, lo que indica que *L. monocytogenes* puede entrar en los mataderos a través de cerdos sanos, convirtiéndose en una fuente de contaminación directa de las canales y la carne durante el sacrificio. Por otro lado, la presencia de *L. monocytogenes* en piezas de carne procedentes del despiece de canales no

contaminadas, indica que el ambiente de las salas de despiece constituye otra fuente de contaminación (Hellström *et al.* 2010).

La presencia de niveles bajos de *L. monocytogenes* en los cerdos vivos a su llegada al matadero puede, por tanto, amplificarse en el ambiente, aumentando su frecuencia durante el procesado, especialmente en la fabricación de productos elaborados con carne picada de cerdo (Wesley *et al.* 2008).

La incidencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y los equipos de las plantas de sacrificio es habitualmente escasa, con valores inferiores al 10% (Autio *et al.* 2000, Farber *et al.* 2007), similares a los que se detectan en canales porcinas (Kanuganti *et al.* 2002, Lindblad *et al.* 2007, Hellström *et al.* 2010). La prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y los equipos de las plantas de procesado de carne de cerdo tras las tareas de limpieza y desinfección es también baja (con valores generalmente inferiores al 10%), pero puede incrementarse notablemente a lo largo de la jornada de trabajo (Chasseignaux *et al.* 2002, Peccio *et al.* 2003).

Las piezas de carne procedentes del despiece suelen presentar valores de contaminación bajos, inferiores al 10% (Wesley *et al.* 2008, Hellström *et al.* 2010). En cambio, pueden encontrarse valores próximos al 30% en algunas materias primas o en productos crudos, que pueden mantenerse (Chasseignaux *et al.* 2001) o aumentar tras el procesado de algunos productos, fundamentalmente los elaborados con carne picada, alcanzando valores hasta del 70% (Thévenot *et al.* 2005b). Por lo tanto, la contaminación de productos cárnicos de cerdo debida a *L. monocytogenes* es relativamente habitual, y un porcentaje considerable de productos RTE, entre los que se incluyen embutidos (cocidos y curados) y jamones, pueden resultar contaminados por *L. monocytogenes* alcanzando niveles del 10% ó incluso mayores (Thévenot *et al.* 2005b, Cabedo *et al.* 2008).

Algunas características inherentes a los productos cárnicos curados (como el contenido en sal y nitritos, y los valores bajos de pH y actividad de agua) contribuyen a la reducción gradual de las poblaciones de bacterias patógenas durante la curación y garantizan habitualmente su seguridad (Mataragas *et al.* 2015). No obstante, estas características resultan insuficientes para impedir la supervivencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos, en los que se ha descrito que un bajo número de células puede persistir durante varias semanas cuando en su elaboración no se han empleado cultivos iniciadores (Encinas *et al.* 1997, Farber *et al.* 2007, Lebert *et al.* 2007).

Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de los embutidos o el ambiente de las plantas en las que éstos se elaboran parecen sobrevivir mejor en los embutidos curados que las cepas procedentes de otras fuentes, por lo que dichas cepas pueden ser difíciles de eliminar (Thévenot *et al.* 2005a). El empleo de bacterias lácticas como cultivos iniciadores o cultivos protectores puede representar una solución para minimizar el riesgo asociado al crecimiento de *L. monocytogenes* durante la maduración y el almacenamiento de los embutidos curados (Työppönen *et al.* 2003), gracias a la producción de ácido láctico y otros metabolitos, entre los que se incluyen las bacteriocinas. Las bacteriocinas producidas por algunas cepas de bacterias lácticas poseen una eficaz actividad frente a *L. monocytogenes* en embutidos curados (Foegeding *et al.* 1992, Hugas *et al.* 1995, Benkerroum *et al.* 2005).

El cerdo ibérico es una raza autóctona del suroeste de la Península Ibérica, tradicionalmente explotada en condiciones extensivas durante su periodo final de vida, lo que favorece la calidad de sus productos (López-Bote 1998). Las características de la raza y las diferencias en las condiciones de explotación, proporcionan a la industria del cerdo ibérico particularidades que deben tenerse en cuenta al estudiar los patrones de contaminación de *L. monocytogenes* en las plantas de sacrificio y procesado en las que se elaboran estos productos cárnicos. Así, por ejemplo, determinadas operaciones que se realizan en el matadero, como el eviscerado, o las operaciones de limpieza que realizan determinadas máquinas (peladoras, raspadoras, flageladoras, etc.) pueden resultar más difíciles de controlar que en otras razas porcinas sometidas a explotación intensiva (Palá y Sevilla 2004).

Algunas de las tecnologías alimentarias que se emplean para garantizar la seguridad microbiológica de los productos cárnicos, como las altas presiones hidrostáticas o su aplicación combinada con otras tecnologías como la bioconservación, pueden provocar efectos diferentes en la supervivencia de *L. monocytogenes* en el jamón ibérico en comparación con otros jamones curados (Morales *et al.* 2006, Hereu *et al.* 2012).

En los embutidos ibéricos curados (elaborados habitualmente de forma tradicional, sin cultivos iniciadores), la selección de cultivos iniciadores entre la microbiota autóctona puede ser de gran importancia para garantizar las características sensoriales de estos productos, derivadas de la composición y la actividad metabólica de dicha microbiota endógena (Benito *et al.* 2007).

También han de tenerse en cuenta las diferencias en los periodos de maduración, que en los productos ibéricos son habitualmente más largos que en otros productos. En el jamón ibérico, por ejemplo, el periodo de maduración es superior a 20 meses, mientras que en jamones curados de cerdo blanco, como Serrano, Parma o Bayona, oscila entre 7 y 14 meses (Jiménez-Colmenero *et al.* 2010).

3.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *L. MONOCYTOGENES*

Las estrictas políticas adoptadas por los gobiernos y agencias alimentarias acerca de los niveles de tolerancia sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, en particular en los alimentos RTE, y la implantación del sistema HACCP por parte de las industrias, precisan la aplicación de técnicas de detección rápidas, sensibles y específicas. El objetivo es la verificación de los límites críticos permitidos del microorganismo, tanto en materias primas, como en productos intermedios y finales. Asimismo, los objetivos de seguridad alimentaria requieren en determinadas ocasiones la aplicación de técnicas de identificación de subtipos que permitan localizar los puntos críticos de control en la cadena de procesado, y establecer medidas correctoras para prevenir, y en su caso reducir, la contaminación de los productos finales.

3.3.1. Detección de *L. monocytogenes*

3.3.1.1. Detección, aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* de alimentos mediante técnicas convencionales

Las técnicas convencionales para la detección, el aislamiento y la identificación de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos y ambientales implican el preenriquecimiento y/o enriquecimiento en medios de cultivo líquidos, seguido del aislamiento en medios sólidos selectivos y, finalmente, la confirmación de los aislados mediante técnicas bioquímicas y/o serológicas (Jadhav *et al.* 2012).

Existen diferentes métodos de referencia para la detección y el aislamiento de *L. monocytogenes* en alimentos, entre los que se encuentran el método desarrollado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA-BAM, *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*), el método del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA, *United States Department of Agriculture*) y los estándares ISO 11290 (ISO 1996, ISO 2004). Dependiendo de la naturaleza de la

muestra, un método en particular puede ser más adecuado que otro para el aislamiento de *L. monocytogenes*. El método de la FDA se emplea para el aislamiento a partir de alimentos con bajos niveles de *Listeria* spp. y microbiota acompañante, como productos lácteos, pescados, marisco, verduras y hortalizas (Hitchins y Jinneman 2011), y el método del USDA se utiliza habitualmente para el aislamiento de carnes rojas o de ave (crudas o RTE), huevos y muestras medioambientales, que suelen presentar niveles altos de microbiota acompañante (USDA 2013). En la Unión Europea, el Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión define los estándares ISO 11290 como los métodos de referencia para la detección y recuento de *L. monocytogenes* en alimentos.

Una técnica de aislamiento debe ser capaz de detectar 1 CFU en 25 g de alimento, sensibilidad que sólo puede alcanzarse mediante el enriquecimiento en medios selectivos. El empleo de antimicrobianos en el enriquecimiento puede dificultar la detección de células dañadas de *L. monocytogenes* presentes en los alimentos (Jantzen *et al.* 2006a), por lo que la mayoría de los métodos suelen llevar a cabo el enriquecimiento selectivo en dos etapas: el método FDA incluye un preenriquecimiento en un medio base sin antimicrobianos, y un enriquecimiento posterior en el mismo medio, tras la adición de los agentes selectivos; en los métodos USDA e ISO 11290, la muestra se somete a un doble enriquecimiento en un medio en el que las concentraciones de los agentes selectivos del enriquecimiento primario son la mitad de las del enriquecimiento secundario.

Tras el enriquecimiento por cualquiera de los métodos, el aislamiento en medios selectivos con esculina permite diferenciar a *Listeria* de otras bacterias por la morfología de sus colonias, de color negro rodeadas de un halo oscuro debido a la reducción de la esculina a esculetina por acción de la β -D-glucosidasa o esculinasa. Los diferentes medios sólidos cromogénicos basados en la detección de determinadas actividades enzimáticas y en la producción de ácido por la fermentación de azúcares, permiten la identificación presuntiva de las especies patógenas de *Listeria* (Jantzen *et al.* 2006b). Muchos de ellos han sido evaluados en una gran variedad de alimentos (Willis *et al.* 2006, Hegde *et al.* 2007, Stessl *et al.* 2009), y actualmente se incluyen en la mayoría de los protocolos de referencia (Hitchins 2003, ISO 2004).

La degradación del L- α -fosfatidilinositol por la enzima PI-PLC de las especies patógenas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* da lugar a la producción de ácidos grasos insolubles en agua, lo que genera un halo opaco de precipitación alrededor de las

colonias (Notermans *et al.* 1991). En 1997, Ottaviani *et al.* combinaron este sistema de detección con la detección de la actividad β -D-glucosidasa de *Listeria* spp. empleando el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucopiranosido (X-gluc), en un medio denominado ALOA. Una amplia variedad de medios comerciales, como CHROMagarTM*Listeria* (CHROMagar), OCLA (Oxoid), Compas L.mono (Biokar), OAA (bioMérieux) o Chromoplate[®] (Merck), se basan en los mismos sistemas de detección (Stessl *et al.* 2009). El medio Brilliance *Listeria* (BR-L) (Oxoid) emplea el mismo sustrato cromogénico que el ALOA para la detección de la actividad β -D-glucosidasa de *Listeria*, pero basa la diferenciación de las especies patógenas en la detección de la actividad PC-PLC.

El medio Rapid'L.mono[®] (Bio-Rad) emplea el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol-mioinositol-1-fosfato (X-IP), en el que las bacterias con actividad PI-PLC desarrollan colonias de color azul, frente al color blanco de las que carecen de dicha actividad (Restaino *et al.* 1999). Este medio permite la diferenciación entre *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* por la ausencia de un halo amarillo alrededor de las colonias de la segunda especie debido a su incapacidad para fermentar la D-xilosa (Lauer *et al.* 2005).

Tras su aislamiento en medios selectivos y diferenciales, diferentes pruebas bioquímicas y el análisis de determinadas características fenotípicas permiten la identificación o confirmación de los aislados a nivel de género o especie (Jantzen *et al.* 2006b). Existen diferentes sistemas comerciales que facilitan y aceleran la identificación de *L. monocytogenes*, algunos de los cuales, como el API *Listeria* (bioMérieux) y el MICRO-ID (Organon Teknika), han sido validados y se han incorporado a los métodos de referencia (USDA 2013, Hitchins y Jinneman 2011).

3.3.1.2. Detección y/o confirmación de *L. monocytogenes* de alimentos mediante técnicas rápidas

Diversas técnicas inmunológicas y moleculares permiten la detección de *L. monocytogenes* de forma mucho más rápida que los métodos microbiológicos, y pueden emplearse también para la confirmación de los aislados (Law *et al.* 2015). Entre las primeras, la técnica inmunoenzimática ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) se ha generalizado gracias a su simplicidad y especificidad para la detección de *Listeria* spp., y se emplea en diversos sistemas comerciales que han sido aprobados por agencias u organismos de seguridad alimentaria. Algunos de los sistemas comerciales disponibles facilitan la automatización completa del proceso, como el sistema VIDAS[®] y su versión

compacta miniVIDAS[®] (bioMérieux), que utilizan la técnica ELFA (*Enzyme-linked Fluorescent Assay*), que incorpora un sistema de detección fluorescente a la técnica ELISA (Ueda y Kuwabara 2010). La técnica de separación inmunomagnética (IMS, *Immunomagnetic Separation*), permite la separación de *Listeria* de la microbiota competidora y los inhibidores y, por tanto, la concentración de las células, bien a partir de enriquecimientos o directamente de los alimentos, aumentando la sensibilidad de los métodos de detección microbiológicos y moleculares (Yang *et al.* 2007, Wadud *et al.* 2010).

Los métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR suponen otra opción para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos, cada vez más empleada por su rapidez, especificidad y posibilidad de automatización. El empleo de cebadores para diversos genes de virulencia, como *hly*, *actA*, *inlA*, *iap* y *plcB*, y para los genes y espaciadores intergénicos de los RNAs ribosómicos 16S y 23S, entre otros, permite la detección específica de *L. monocytogenes* (Jadhav *et al.* 2012).

Mediante PCR multiplex es posible la detección simultánea de *L. monocytogenes* y otros patógenos o diferenciar *L. monocytogenes* del resto de las especies del género *Listeria* (Law *et al.* 2015).

Se han desarrollado numerosos protocolos basados en la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real (qPCR) para la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* en alimentos (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2007, Postollec *et al.* 2011), cuya principal ventaja es la reducción del tiempo de obtención de resultados (Aparecida de Oliveira *et al.* 2010). En el mercado se encuentran disponibles diversos sistemas comerciales de qPCR para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos (Law *et al.* 2015), entre los que destaca el sistema BAX[®] *Listeria monocytogenes Detection System* (DuPont-Qualicon), que se ha incluido en los protocolos del método USDA para el análisis de muestras de carne tras su enriquecimiento (USDA 2012).

El bajo nivel de la contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* (normalmente por debajo de 100 células por gramo de alimento) y a la baja sensibilidad de la técnica (más de 1000 células por gramo), convierten a la qPCR en un ensayo cualitativo (presencia/ausencia), a pesar de que la técnica en sí es cuantitativa. Además de la baja sensibilidad, la qPCR también comparte con los ELISA la necesidad de confirmar los resultados positivos mediante cultivo, lo que supone una ampliación considerable del tiempo de análisis (Martínez-Campos *et al.* 2012).

Los métodos de nueva generación que se encuentran actualmente en desarrollo, cuyo objetivo final es evitar el preenriquecimiento y lograr alternativas al cultivo cuantitativo convencional, incluyen los biosensores y los *microarrays* de DNA que tienen, potencialmente, la capacidad de detectar directamente (*on line*) y a tiempo real todos los patógenos relevantes para cada tipo de alimento (Martínez-Campos *et al.* 2012).

3.3.2. Identificación de subtipos

En el campo de la epidemiología de la listeriosis, la identificación de los subtipos y grupos clonales de *L. monocytogenes* con capacidad para provocar enfermedad tiene una gran importancia. El estudio de los subtipos también permite detectar las rutas de transmisión a través de las cuales *L. monocytogenes* llega a los productos finales en las plantas de procesado, y determinar posibles patrones de persistencia, lo que facilita la aplicación de estrategias eficaces para prevenir la contaminación (Chen *et al.* 2008).

3.3.2.1. Técnicas fenotípicas de identificación de subtipos

Las técnicas fenotípicas que han sido tradicionalmente más utilizadas en la identificación de subtipos de *L. monocytogenes* son el análisis de fagotipos (Wiedmann 2002), la electroforesis de isoenzimas (Graves *et al.* 2007) y el análisis de serotipos, si bien las dos primeras apenas se utilizan actualmente. Las cepas de *L. monocytogenes* se dividen en serotipos en función de los antígenos somáticos o de membrana (O) y flagelares (H), que son detectados mediante la reacción de diferentes estructuras terciarias de dichos antígenos con anticuerpos específicos. El análisis de serotipos presenta diversas limitaciones, entre las que se encuentran su elevado coste y lentitud, y la posibilidad de que los antígenos de algunas cepas sufran una reacción cruzada con diferentes anticuerpos, o de que algunas cepas no expresen antígenos detectables en su superficie (Riley 2004). Por otro lado, la capacidad discriminante de la técnica es baja; tan sólo permite clasificar la especie en 13 serotipos y, teniendo en cuenta que la mayoría de los brotes de listeriosis son causados por cepas pertenecientes a los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b, su uso para identificar subtipos resulta poco útil en estudios epidemiológicos (Kathariou 2002).

3.3.2.2. Técnicas genotípicas de identificación de subtipos

Las técnicas genotípicas se basan principalmente en la detección de las diferencias en las secuencias de nucleótidos mediante PCR, mediante el tratamiento del DNA con

enzimas de restricción o mediante la secuenciación directa de determinadas regiones del DNA.

Identificación de serotipos mediante PCR

Debido a las limitaciones del estudio de los serotipos mediante técnicas inmunológicas, se han desarrollado protocolos de PCR multiplex que permiten la identificación de los principales grupos de serotipos de *L. monocytogenes* gracias al empleo de una combinación de múltiples cebadores que amplifican fragmentos de genes específicos de los diferentes linajes y serotipos (Borucki y Call 2003, Doumith *et al.* 2004 y 2005): el grupo IIa (serotipos 1/2a y 3a), el grupo IIb (serotipos 1/2b, 3b y 7), el grupo IIc (serotipos 1/2c y 3c) y el grupo IVb (serotipos 4b, 4d y 4e). Aunque esta técnica no permite diferenciar todos los serotipos de cada grupo, los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b representan, al menos, al 95% de los aislados procedentes de alimentos y pacientes con listeriosis, por lo que la PCR multiplex puede considerarse como una alternativa al análisis convencional de serotipos, particularmente en estudios a largo plazo e investigaciones epidemiológicas (Doumith *et al.* 2004).

Análisis con enzimas de restricción

La estrategia más empleada para identificar subtipos de *L. monocytogenes* es la digestión del DNA total de cada cepa con endonucleasas de restricción con secuencias de reconocimiento poco frecuentes, que dan lugar a fragmentos de gran tamaño que se separan mediante electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*). El elevado nivel de estandarización de esta técnica y su alta capacidad de discriminación entre cepas la han convertido en el método de referencia para la identificación de los subtipos de *L. monocytogenes*. En Estados Unidos, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), que aplica dicha técnica a diferentes patógenos desde 1996, creó la red *PulseNet International* (<http://www.pulsenetinternational.org>), en la que participan laboratorios del sistema sanitario público y agencias alimentarias, como un sistema de identificación de subtipos y vigilancia epidemiológica para la detección y seguimiento de brotes de infecciones de origen alimentario (Martin *et al.* 2006).

El protocolo estandarizado de PFGE para *L. monocytogenes* del CDC (Halpin *et al.* 2010), incluye el empleo de las enzimas de restricción *AscI* y *ApaI*. Numerosos estudios han confirmado el excelente poder de discriminación de esta técnica cuando se usa con

los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de alimentos, plantas de procesado o pacientes con listeriosis (Fugett *et al.* 2007, López *et al.* 2007 y 2008, Ward *et al.* 2010), así como la utilidad de las bases de datos de subtipos para la interpretación de resultados (Nucera *et al.* 2010).

Secuenciación de múltiples genes (MLST)

La identificación de subtipos mediante secuenciación de múltiples genes (MLST, *Multilocus Sequence Typing*) se basa en la secuenciación y detección de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) en un fragmento de pequeño tamaño (alrededor de 500 pb) de varios genes constitutivos esenciales de la célula (*housekeeping genes*) (Stessl *et al.* 2014). Estos genes generalmente están muy conservados, por lo que su secuenciación proporciona información sobre la relación evolutiva entre aislados.

En el caso de *L. monocytogenes*, se ha observado en algunos casos un poder de discriminación de esta técnica superior al de la técnica de PFGE (Revazishvili *et al.* 2004). Uno de los protocolos más usados de MLST de *L. monocytogenes* (Ragon *et al.* 2008) analiza regiones de seis genes que codifican un transportador ABC (*abcZ*), y las enzimas aminotransferasa de d-aminoácidos (*dat*), catalasa (*cat*), succinil diaminopimelatodessuccinilasa (*dapE*), β -glucosidasa (*bglA*), e histidinaquinasa (*lhkA*), incluyendo en algunos casos el gen de la lactato deshidrogenasa (*ldh*) para mejorar la discriminación entre los subtipos.

Con el fin de facilitar la comparación entre laboratorios de los patrones de MLST, se encuentra disponible una base de datos creada por el Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.htm>). Algunos perfiles alélicos incluidos en esta base de datos se han identificado como subtipos persistentes en diferentes cadenas de procesado de alimentos de diversos países europeos (Schmitz-Esser *et al.* 2015).

3.3.3. Secuenciación del genoma completo

El aumento exponencial de la capacidad y velocidad de generación de datos genómicos, y la reducción de costes provocados por el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS, *Next-Generation Sequencing*), han facilitado enormemente el acceso a la secuenciación genómica. Los métodos de secuenciación de última generación o ultrasecuenciación, basados en una secuenciación masiva en paralelo,

permiten obtener la secuencia de millones de fragmentos de DNA de forma simultánea. Las tecnologías de ultrasecuenciación que dominan el mercado actualmente se denominan de “segunda generación”, para diferenciarlas de la primera generación de métodos de secuenciación basados en el método de Sanger (Sanger *et al.* 1977). Ambas tecnologías incluyen los procesos de preparación de la muestra, secuenciación, y obtención y análisis de los datos. En el caso de la ultrasecuenciación, la preparación de la muestra incluye la ruptura al azar del DNA de interés en fragmentos pequeños, que posteriormente se unen a un soporte, como nanoesferas en suspensión o una interfaz sólida, dependiendo de la tecnología utilizada. La inmovilización en espacios separados de los fragmentos de DNA molde, permite que se produzcan de manera simultánea entre miles y millones de reacciones de secuenciación, mediante un proceso de sucesivas incorporaciones de nucleótidos, lavado y escaneado, con el que finalmente se recogen los datos de la secuencia. Las tecnologías disponibles en la actualidad se diferencian según la longitud de las lecturas que producen, y la tecnología química específica que emplean para secuenciar y leer las moléculas de DNA generadas. Las llamadas tecnologías de “tercera generación” poseen una eficacia similar a las actuales, pero con menor coste y lecturas más largas gracias a novedosos métodos de lectura (Henson *et al.* 2012).

En la actualidad, la aplicación de la WGS a la vigilancia de la salud pública permite caracterizar los aislados de los patógenos alimentarios a un nivel desconocido hasta ahora, proporcionando nuevos y amplios conocimientos acerca de la biología y transmisión de los mismos (Bergholz *et al.* 2014, FDA 2015). Con respecto a *L. monocytogenes*, el alto poder de discriminación de la técnica de PFGE ha sido fundamental en la detección e investigación de los brotes de listeriosis (Kathariou *et al.* 2006, Gilmour *et al.* 2010, Laksanalamai *et al.* 2012). La WGS probablemente reemplazará a la PFGE en los laboratorios de seguridad alimentaria, al permitir una caracterización más detallada de los aislados de *L. monocytogenes* (Gilmour *et al.* 2010, Nightingale 2010, FDA 2015).

Desde la secuenciación del genoma de la cepa *L. monocytogenes* EGD-e y una cepa de *L. innocua* (Glaser *et al.* 2001), se han publicado las secuencias de un gran número de genomas completos de *Listeria*, que han contribuido al conocimiento sobre la patogenicidad de *Listeria* y la epidemiología de los brotes de listeriosis, y sobre cómo *L. monocytogenes* se replica en determinados nichos ecológicos. Tras la publicación del

trabajo de Glaser *et al.* (2001), se añadieron las secuencias de tres cepas clínicas de *L. monocytogenes* y se llevó a cabo su comparación con la cepa EGD-e, revelando que la organización del genoma de *L. monocytogenes* está altamente conservada, conteniendo un gran número de genes ortólogos (Nelson *et al.* 2004). Como inicialmente se observó en la comparación entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*, los genomas de cada cepa también poseen un considerable número de rasgos específicos, muchos de los cuales se encuentran organizados en pequeñas zonas responsables de la denominada plasticidad de los genomas. La secuenciación del genoma de otras cepas de *L. monocytogenes* ha permitido identificar rasgos específicos relacionados con la virulencia (Bécavin *et al.* 2014), la persistencia (Orsi *et al.* 2008, Stasiewicz *et al.* 2015) o la resistencia a los desinfectantes (Müller *et al.* 2013, Schmitz-Esser *et al.* 2015). La comparación de las secuencias genómicas de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a los desinfectantes podría contribuir a la identificación de nuevos genes relacionados con los fenotipos de resistencia (Kastbjerg *et al.* 2014).

4. OBJETIVOS

Los resultados de numerosos trabajos en los que se han examinado las rutas de contaminación de *L. monocytogenes* en la industria porcina, muestran habitualmente una incidencia baja del patógeno tanto en las canales como en el ambiente y los equipos de las plantas de sacrificio de cerdo. En cambio, la contaminación de los productos crudos de cerdo es relativamente común, y una proporción considerable de productos RTE, incluidos embutidos cocidos o curados y jamones, también resultan contaminados con frecuencia.

A pesar de las características inherentes a los productos curados, que favorecen la reducción gradual de *L. monocytogenes* durante el proceso de curación, diversos factores como el nivel y origen de la contaminación, la elaboración sin cultivos iniciadores, o la temperatura y duración del periodo de maduración, pueden permitir la supervivencia durante varias semanas de un bajo número de células de *L. monocytogenes* en los embutidos curados. Si bien el empleo de cultivos protectores puede ofrecer una solución para minimizar ese riesgo, su eficacia puede verse afectada por condiciones del procesado como la temperatura y el pH, la composición de los productos, y los niveles de inoculación o las cepas empleadas.

Por otro lado, las cepas de *L. monocytogenes* que se aíslan de los embutidos o el ambiente de las plantas en las que éstos se elaboran, parecen sobrevivir mejor en los embutidos curados que las cepas procedentes de otras fuentes, por lo que algunas cepas pueden ser difíciles de eliminar. Se han observado, además, diferencias en la capacidad de respuesta al estrés entre diferentes serotipos de *L. monocytogenes* y, en particular, en su supervivencia tras la exposición a bacteriocinas.

La clasificación en subtipos moleculares de los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de productos cárnicos y del ambiente de las plantas de procesado donde éstos se elaboran, muestra habitualmente la presencia de un reducido número de cepas y la persistencia durante largos periodos de tiempo de cepas específicas que sobreviven a la limpieza y la desinfección. Entre los mecanismos que facilitan la supervivencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de las plantas de procesado de alimentos se incluyen la formación de *biofilm*, la adquisición de resistencia a antimicrobianos y la resistencia al estrés.

En los *biofilms*, las células bacterianas son más resistentes al estrés y a los tratamientos de limpieza y desinfección que las células en suspensión, lo que podría facilitar la supervivencia ambiental de determinadas cepas de *L. monocytogenes* y explicar su

persistencia durante largos periodos de tiempo, incluso años, en las plantas de procesado. Numerosos factores, entre ellos algunas propiedades específicas de las cepas, pueden afectar a la formación de *biofilm*.

La tendencia de *L. monocytogenes* a persistir en el ambiente de las plantas de procesado tras la desinfección, puede provocar la selección y diseminación de clones con susceptibilidad reducida a los desinfectantes. La resistencia a los desinfectantes basados en QACs, como el BAC, podría ser especialmente relevante en la adaptación de *L. monocytogenes* al ambiente de las plantas de procesado de alimentos, en las que dichos compuestos se emplean de forma extensiva. Se han identificado diferentes marcadores genéticos que confieren a *L. monocytogenes* resistencia a los QACs (entre ellos el determinante de resistencia *bcrABC* y el gen *qacH* del transposón Tn6188) que codifican sistemas de expulsión del grupo SMR. Existen otras bombas de expulsión del grupo MFS, como MdrL y Lde, que también se asocian a la adaptación y resistencia al BAC de *L. monocytogenes*.

Teniendo en cuenta lo anterior, los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Estudiar los diferentes subtipos de *L. monocytogenes* que se encontraban contaminando el ambiente y los productos de una planta de sacrificio y elaboración de productos de cerdo ibérico (Planta A), con el fin de identificar las rutas de contaminación y posibles patrones de persistencia.
2. Analizar el efecto de diferentes cultivos protectores sobre la viabilidad de un grupo de subtipos de *L. monocytogenes* aislados repetidamente a partir de productos frescos y/o curados procedentes de la Planta A, mediante un ensayo rápido que simula el inicio de la fermentación del chorizo ibérico.
3. Determinar las características fenotípicas y genotípicas de los subtipos identificados en la Planta A, y estudiar la asociación de características específicas con la supervivencia a la desinfección y la persistencia prolongada de *L. monocytogenes* en la planta.
4. Evaluar la influencia de concentraciones subinhibitorias de determinados biocidas y de la MIC de la cepa, sobre la formación de *biofilm* por *L. monocytogenes*.
5. Analizar la persistencia ambiental de *L. monocytogenes* en una nueva planta de procesado de productos RTE perteneciente a la misma empresa (Planta B), y

evaluar la relación de la resistencia a los desinfectantes con la persistencia. Finalmente, identificar mediante secuenciación genómica características moleculares que pudieran desempeñar un papel importante en la persistencia ambiental de subtipos concretos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. CEPAS DE COLECCIÓN

En los experimentos se emplearon las cepas de colección y de otros laboratorios, que se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos de colección empleados.

Organismo	Cepa ^a	Serotipo de <i>Listeria</i>	Procedencia ^a	Referencia
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 35152	1/2a	CECT	www.cect.org
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 15313T	1/2a	CECT	www.cect.org
<i>L. monocytogenes</i>	EGD-e (ATCC BAA-679)	1/2a	J.C. Pérez- Díaz, HRYC	Glaser <i>et al.</i> 2001
<i>L. monocytogenes</i>	Scott A (CECT 5672)	4b	CECT	www.cect.org
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 936	1/2b	CECT	www.cect.org
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19112	1/2c	CECT	www.cect.org
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115	4b	CECT	www.cect.org
<i>L. monocytogenes</i>	P14-A ^b	4b	M. Suárez, UCM	Ripio <i>et al.</i> 1997
<i>L. monocytogenes</i>	4423	1/2a	S. Schmitz-Esser, IMH	Müller <i>et al.</i> 2013
<i>L. monocytogenes</i>	CDL 69	1/2a	S. Schmitz-Esser, IMH	Müller <i>et al.</i> 2013
<i>Salmonella</i> Braenderup	H9812	NA ^c	C. Jacquet, IP	Hunter <i>et al.</i> 2005
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	NA ^c	CECT	www.cect.org
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	NA ^c	CECT	www.cect.org
<i>Lactobacillus sakei</i>	CTC494	NA ^c	M. Garriga, IRTA	Hugas <i>et al.</i> 1995

^a ATCC, *American Type Culture Collection*; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; IP, *Institut Pasteur* (París); IRTA, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (Girona); IMH, *Institute for Milk Hygiene* (Viena); HRYC, Hospital Ramón y Cajal (Madrid); UCM, Universidad Complutense de Madrid. ^b mutante espontáneo de la cepa clínica humana P14. ^c NA, no aplicable.

5.2. MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo líquidos

BHI – Infusión de cerebro y corazón (bioMérieux).

FB – Medio de Fraser. El suplemento selectivo contiene ácido nalidíxico (20 mg/l) y acriflavina (24 mg/l) (Biolife).

TSYEB – Medio de triptona de soja y extracto de levadura (Biolife).

sTSYEB – TSYEB (Biolife) suplementado con glucosa (1%) y NaCl (2%).

UVM1 – Medio UVM suplementado con ácido nalidíxico (20 mg/l) y acriflavina (12 mg/l) (Biolife).

Medios de cultivo sólidos

Agar Mueller Hinton – (Biolife).

Agar sangre – Agar Columbia suplementado con sangre de cordero (5%) (bioMérieux).

BHI semisólido – BHI (bioMérieux) con agar (0.4%).

Brilliance™ *Listeria* – Medio selectivo para el género *Listeria* y diferencial para *L. monocytogenes*/*L. ivanovii* (contiene lecitina) (Oxoid).

CEYM – Medio con carbón activado y yema de huevo. Contiene BHI (bioMérieux) suplementado con emulsión de yema de huevo (0.5%) (Biolife), carbón activado (0.5%) (Merck), NaCl (1.75%) y agar (1.5%).

CHROMagar™ *Listeria* – Medio selectivo para el género *Listeria* y diferencial para *L. monocytogenes*/*L. ivanovii* (contiene inositol) (CHROMagar).

MOX – Medio de Oxford modificado. Contiene medio de Oxford base (Biolife), y un suplemento selectivo (*Listeria* MOX-COL) (Biolife), que incluye moxalactam (15 mg/l) y colistina (10 mg/l).

RAPID'L.mono™ – Medio selectivo para el género *Listeria* y diferencial para *L. monocytogenes* (contiene inositol y xilosa) (Bio-Rad).

TSYEA – Agar triptona de soja y extracto de levadura (Biolife).

5.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS ESTANDARIZADOS

Todas las cepas se conservaron congeladas a -20 °C en TSYEB con glicerol al 15%.

La preparación de inóculos se realizó tras dos cultivos consecutivos de las cepas en TSYEA, incubados a 37 °C durante 48 y 24 h respectivamente. Del segundo cultivo se tomaron varias colonias que se resuspendieron en 3 ml de agua peptonada estéril al 0.1% (Biolife), y la densidad óptica de las suspensiones bacterianas se ajustó mediante espectrofotometría (con un Spectronic 20D) a una OD₆₀₀ de 0.85, para obtener inóculos de 10⁹ CFU/ml. A continuación, la concentración de los inóculos se ajustó al nivel requerido para cada ensayo mediante diluciones seriadas en el medio de cultivo correspondiente.

La concentración de los inóculos se confirmó mediante el recuento en placa de las CFU. Para ello, se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada, y se sembraron 100 µl de las diluciones apropiadas para el recuento de colonias en placas de TSYEA. El recuento del número de CFU se realizó tras 48 h de incubación aerobia a 37 °C.

5.4. TOMA DE MUESTRAS

5.4.1. Instalaciones incluidas en el estudio

El estudio se realizó en dos plantas diferentes (que denominaremos A y B) de la empresa Embutidos Fermín, S.L. (Salamanca). En el año 2005 en que comenzó este estudio, Embutidos Fermín era la única empresa española con matadero autorizado para exportar sus productos cárnicos de cerdo a EE.UU.

Las instalaciones de la Planta A constan de un matadero industrial de tamaño medio (con una capacidad de sacrificio de 300 animales/día), y una planta de procesado en la que principalmente se elaboran productos cárnicos curados. Los productos se procesan como piezas enteras (jamones, paletas y lomos) o como embutidos elaborados a partir de carne picada (chorizo y salchichón), e incluyen más de 30 variedades de productos de diferente tamaño, composición, condiciones de maduración, etc.

Las instalaciones de la Planta B, situada a 22 km de la Planta A, se dedican al loncheado y envasado de productos cárnicos crudos y productos curados RTE procedentes de la Planta A.

5.4.2. Programa de muestreo

La duración del estudio inicial de la Planta A fue de tres años (agosto 2005- julio 2008), a lo largo de los cuales se analizaron regularmente el ambiente, los equipos, las materias primas y los productos, como parte fundamental del programa de control de *L. monocytogenes* en las instalaciones. En general, se tomaron muestras específicas mensualmente, y cada 3 ó 4 meses se llevaron a cabo muestreos más extensos. Finalizado el estudio inicial de tres años, se realizaron nuevos muestreos y análisis durante un año adicional (agosto 2008- julio 2009) para evaluar el resultado de las medidas correctoras adoptadas en la Planta A.

La duración del estudio de la Planta B fue de 27 meses (noviembre 2008- enero 2011). Las únicas muestras incluidas en el estudio de la Planta B fueron ambientales y de los equipos.

Todos los muestreos fueron realizados por el personal de la empresa.

5.4.3. Procedimiento de muestreo

Muestras ambientales y de equipos

Se tomaron muestras ambientales y de los equipos en cada etapa del procesado, en las diferentes áreas de las plantas A y B, y se escogieron como puntos de muestreo aquellos que, de acuerdo con la bibliografía, tenían mayor probabilidad de albergar *L. monocytogenes* (Kornacki y Gurtler 2007). Las muestras se recogieron tras las operaciones de limpieza y desinfección, justo antes del inicio de la jornada de trabajo.

Las muestras ambientales procedían de superficies no expuestas a contacto directo con materias primas o productos (suelos, paredes, techos, etc.) y aguas de desagües o sumideros. Las muestras de equipos procedían de componentes de máquinas y equipos, expuestos o no al contacto directo con los alimentos.

Para la toma de muestras de superficies se emplearon esponjas secas (Whirlpak, Nasco VWR International), prehidratadas con medio de cultivo líquido estéril o con solución neutralizante. Las esponjas se frotaron durante 1 min sobre el área de muestreo, cuyo tamaño varió entre 5 cm² (en cuchillos y sierras) y 1 m² (en cintas transportadoras, suelos o puertas). En los sumideros y desagües se tomaron muestras de 50 ml de líquido para cada análisis. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su recepción en el laboratorio.

Muestras de productos

Se tomaron muestras de las canales y de las principales categorías de productos: productos del despiece inicial, productos elaborados intermedios (en cualquier fase del proceso de elaboración, sin finalizar la etapa de curado-madurado), y productos curados.

Las muestras de canales se tomaron en el matadero, antes del despiece, mediante frotado con esponjas. Las muestras de productos del despiece inicial se tomaron en la sala de despiece, también por frotado con esponjas. Del resto de los productos se tomaron muestras de 25 g (de los productos elaborados intermedios en el obrador, y de los productos curados en los secaderos, al final de la etapa de curado-madurado). Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su recepción en el laboratorio.

Otras muestras incluidas en los análisis

Además de las muestras procedentes directamente de las instalaciones, se incluyeron muestras tomadas en la empresa y analizadas en otros laboratorios para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* siguiendo el método ISO 11290 (ISO 1996, ISO 2004). Estas muestras se recibieron en tubos con los medios de enriquecimiento del método ISO y en placas de agar sangre.

5.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *L. MONOCYTOGENES*

5.5.1. Métodos de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*

Con todas las muestras procedentes directamente de la empresa cárnica, se empleó el procedimiento del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) para la detección de *L. monocytogenes* en productos cárnicos y muestras ambientales (USDA 2013). Con las muestras procedentes de productos curados, se realizó también la detección y enumeración simultáneas según los métodos descritos en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la Administración de Alimentos y Medicamentos norteamericana (FDA) (Hitchins y Jinneman 2011), mediante la siembra directa en CHROMagarTM *Listeria* de 0.1 ml del homogeneizado. En la mayor parte de las muestras positivas se aisló y analizó una sola colonia. En determinadas muestras positivas, principalmente ambientales y de superficies de canales, se seleccionaron aleatoriamente varias colonias (hasta diez) para la posterior identificación del subtipo, con el fin de detectar diferentes cepas de *L. monocytogenes* presentes en una misma muestra (Navas *et al.* 2007, Von Laer *et al.* 2009).

5.5.2. Identificación de *L. monocytogenes*

En todos los casos, la identificación presuntiva de *L. monocytogenes* se realizó mediante cultivo en CHROMagar™ *Listeria*. La confirmación de los aislados de *L. monocytogenes* se realizó mediante la PCR multiplex descrita por Doumith *et al.* (2004) para identificar el grupo de serotipo, que permite simultáneamente la confirmación del género *Listeria* y de la especie.

5.6. EXTRACCIÓN DE DNA

5.6.1. Lisados de colonias bacterianas

A partir de cultivos puros de *L. monocytogenes* en placas de TSYEA incubadas a 37 °C durante 24 h, se resuspendieron varias colonias en 50 µl de una mezcla de SDS (dodecil sulfato sódico) al 0.25% y NaOH 0.05 M. La lisis se realizó por calentamiento a 99 °C durante 15 min, tras lo cual se añadieron 200 µl de agua destilada estéril y los tubos se centrifugaron brevemente a 13000 rpm, recuperándose a continuación los sobrenadantes con el DNA.

5.6.2. Obtención de DNA genómico purificado

La obtención de DNA genómico purificado de las cepas de *L. monocytogenes* se realizó mediante el Wizard® Genomic Purification Kit (Promega), a partir de cultivos en medio TSYEB incubados a 37 °C durante 18 h.

5.7. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE DNA

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Los cebadores empleados en las reacciones de amplificación de DNA (tabla 2) fueron sintetizados por MWG Biotech AG, y se almacenaron en agua sin nucleasas a -20 °C.

La detección de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) con bromuro de etidio (0.1 µg/ml). Se emplearon el tampón de carga Gel loading dye blue 6x (Biolabs) y el marcador de peso molecular PCR 100 bp low ladder (Sigma-Aldrich).

Tabla 2. Cebadores empleados en las reacciones de amplificación o secuenciación de DNA

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Longitud del gen o fragmento (pb)	Referencia
<i>lmo0737</i>	lmo0737F	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	Doumith <i>et al.</i> 2004
	lmo0737R	ACGATTCTGCTTGCCATTC		
<i>lmo1118</i>	lmo1118F	AGGGGTCTTAAATCCTGGGAA	906	Doumith <i>et al.</i> 2004
	lmo1118R	CGGCTTGTTCCGGCATACTTA		
ORF2819	ORF2819F	AGCAAAATGCCAAAACTCGT	471	Doumith <i>et al.</i> 2004
	ORF2819R	CATCACTAAAGCCTCCCATTTG		
ORF2110	ORF2110F	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	Doumith <i>et al.</i> 2004
	ORF2110R	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
<i>prs</i>	prsF	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	Doumith <i>et al.</i> 2004
	prsR	CAAAGAAACCTTGGATTGCGG		
<i>flaA</i>	flaF	TTACTAGATCAAAGTCT C	538	Borucki y Call 2003
	flaR	AAGAAAAGCCCCTCGTCC		
<i>inlA</i>	Ragon F0	CGGATGCAGGAGAAAAATCC	2400	Ragon <i>et al.</i> 2008
	Ragon R0	CTTTCACACTATCCTCTCC		
	Ragon F1	GATATAACTCCACTTGGG		
	Ragon R1	GCTCTAAGTTAGTGAGTGCG		
	Ragon F2	GTGGACGGCAAAGAAAC		
	RagonR2	GAGATGTTGTTACACCGTC		
<i>prfA</i>	prfAF	AACGGGATAAAACCAAAACCA	469	Zhang <i>et al.</i> 2004
	prfAR	TGCGATGCCACTTGAATATC		
<i>qacH</i>	qacHfwd	ATGTCATATCTATATTTAGC	366	Müller <i>et al.</i> 2013
	qacHrev	TCACTCTTCATTAATTGTAATAG		
<i>radC</i>	radCfwd	CTTGCCAATGATAATATGATC	200 (-Tn6188) 5310 (+Tn6188)	Müller <i>et al.</i> 2013
	radCrev	GTGGTCTGAATGCTCCATCG		
<i>bcrABC</i>	BcF5	GGAGGGTAATCATGTCAG	1312	Elhanafi <i>et al.</i> 2010
	BcR	GTATAATCCGGATGCTGCCC		

La electroforesis se realizó a 90 V durante 60 min, tras lo cual se observaron los geles con luz ultravioleta mediante un equipo Gel Doc 2000 Image Documentation System (Bio-Rad).

5.8. SECUENCIACIÓN DE DNA

5.8.1. Secuenciación del gen *inlA* y de un fragmento del gen *prfA*

El gen *inlA* completo (2400 pb) se secuenció empleando las condiciones de PCR y los cebadores descritos por Ragon *et al.* (2008): Ragon F0 y Ragon R0 para la amplificación, y Ragon F1, Ragon R1, Ragon F2 y Ragon R2 para la secuenciación (tabla 2).

En el caso del gen *prfA* se secuenció un fragmento interno de 469 pb, empleando cebadores específicos descritos previamente (Zhang *et al.* 2004), con las condiciones de PCR descritas en dicho trabajo (tabla 2).

Para su secuenciación, los productos de PCR se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). La secuenciación se realizó utilizando el BigDye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), con el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Instituto de Salud Carlos III). Las secuencias de DNA se procesaron con el programa BioEdit 7.2.1 (Ibis Biosciences), y su alineamiento se realizó con el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Las secuencias de los genes *prfA* e *inlA* se compararon con las respectivas secuencias de la cepa de *L. monocytogenes* EGD-e (NC_003210.1). La presencia de codones de parada en las secuencias del gen *inlA* se analizó mediante el programa ORF Finder (*Open Reading Frame Finder*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), con los siguientes números de identificación: de JQ345449 a JQ345477 (*prfA*); y de HQ111527 a HQ111555, y de KM590945 a KM590947 (*inlA*).

5.8.2. Secuenciación de genomas completos

Construcción de librerías y secuenciación

Las secuencias genómicas de las cepas de *L. monocytogenes* S1, S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3 se obtuvieron mediante la técnica de secuenciación al azar del genoma completo (WGS, *whole-genome shotgun sequencing*). A partir del DNA genómico purificado de

cada cepa, se prepararon las librerías en el Instituto de Salud Carlos III con la tecnología TruSeq (Illumina). La secuenciación se realizó con la plataforma MiSeq de Illumina (2 x 250 nucleótidos leídos desde los dos extremos).

Ensamblado y anotación de los genomas

Las lecturas generadas para cada una de las cepas secuenciadas se filtraron y se ensamblaron *de novo* mediante el programa Spades 3.1.1 (Nurk *et al.* 2013).

Después de ensambladas las secuencias se depositaron en la base de datos DDBJ/EMNL/GenBank, con los siguientes números de acceso: JWHI000000000, JWHG000000000, JWHJ000000000, JWHK000000000 y JWHE000000000, correspondientes a S1 [160908], S10-1 [160908], S2-2 [260510], S2-3 [240810] y S10-3 [161210], respectivamente.

La localización y anotación de los genes en las secuencias de cada uno de los genomas se realizó automáticamente empleando los servidores RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz *et al.* 2008) y PGAAP (*Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline*) del NCBI (Angiuoli *et al.* 2008).

5.8.3. Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis y la comparación de los genomas

La comparación global de los genomas se realizó mediante la versión 2.3.1 del *software* de alineamiento múltiple de secuencias genómicas conservadas con reordenamientos (MAUVE, *Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements*) (Darling *et al.* 2010), y mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La secuencia del genoma de *L. monocytogenes* EGD-e (con número de acceso NC_003210.1 en la base de datos DDBJ/EMNL/GenBank) se empleó como genoma referencia en la comparación.

El número de genes específicos en cada genoma se analizó respecto a cada uno de los otros genomas estudiados. La secuencia del genoma a analizar se comparó con la secuencia de un segundo genoma diana mediante el algoritmo BLAT (BLAST-Like Alignment Tool) (Kent 2002) Un gen se consideró específico de una cepa si en el genoma diana no había secuencias con una identidad mínima del 50% en al menos el 50% de su longitud.

Para detectar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) presentes en cada genoma respecto a la cepa de referencia EGD-e y al resto de los genomas estudiados, se utilizó el *software* bioinformático MUMmer Sequence Alignment (Delcher *et al.* 2003).

El análisis *in silico* de los genes del esquema MLST de *L. monocytogenes* (Ragon *et al.* 2008) en la secuencia del genoma de cada cepa, se llevó a cabo a través del servidor MLST 1.7 (www.cbs.dtu.dk/services/MLST) (Larsen *et al.* 2012). Para identificar los perfiles alélicos o tipo de secuencias (STs, *sequence types*) se empleó la base de datos MLST de *L. monocytogenes* del Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>) (Jolley *et al.* 2004).

La identificación y anotación *in silico* de secuencias de profagos en cada uno de los genomas secuenciados se realizó a través del servidor PHAST (*PHAge Search Tool*) (<http://phast.wishartlab.com/>) (Zhou *et al.* 2011).

La detección en las secuencias genómicas de las regiones CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) se realizó mediante el programa CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr/>).

5.9. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN DE SUBTIPOS DE *L. MONOCYTOGENES*

5.9.1. Identificación del serotipo molecular mediante PCR

PCR multiplex para la identificación del grupo de serotipo

El serotipo molecular de los aislados se identificó mediante una reacción de PCR multiplex que separa los principales serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) en cuatro grupos de serotipos (Doumith *et al.* 2004).

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de lisados de colonias de cada aislado, utilizando los cebadores (tabla 2) y las condiciones descritos por Doumith *et al.* (2004). Como control se incluyeron cuatro cepas de referencia de *L. monocytogenes*: ATCC 35152 (serotipo 1/2a), CECT 936 (serotipo 1/2b), ATCC 19112 (serotipo 1/2c) y ATCC 19115 (serotipo 4b) (tabla 1).

PCR del gen flaA

Para confirmar el serotipo de algunas cepas atípicas 1/2a, 3a y 1/2c se amplificó una región de 538 pb del gen *flaA*, utilizando los cebadores (tabla 2) y las condiciones descritos previamente (Kérouanton *et al.* 2010). Como control se incluyeron las cepas de referencia de serotipo 1/2a y serotipo 1/2c mencionadas anteriormente (tabla 1).

5.9.2. Electroforesis en gel en campo pulsante

Extracción y digestión del DNA para PFGE

Tanto en el caso de los aislados de *L. monocytogenes* como en el de la cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 (tabla 1) utilizada como patrón, la extracción y digestión del DNA para PFGE se llevó a cabo según los protocolos estandarizados de la red *PulseNet* de EE. UU. (Halpin *et al.* 2010, Hunter *et al.* 2005). La digestión del DNA de los aislados de *L. monocytogenes* se realizó con las enzimas *AscI* y *ApaI* (New England Biolabs), y en el caso del DNA de *Salmonella* con *XbaI* (New England Biolabs).

Análisis de perfiles de restricción e identificación de pulsotipos

Para la separación de los fragmentos de restricción mediante PFGE se utilizó agarosa SeaKem Gold (Pronadisa) al 1% en tampón TBE (Tris-borato 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3). La electroforesis se realizó a 14 °C durante 24 h en un equipo CHEF DR II (Bio-Rad), con una duración de pulsos inicial y final de 4 y 40 s respectivamente, un gradiente de 6 V/cm, y un ángulo de 120°. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Las imágenes obtenidas con un equipo Gel Doc 2000 Image Documentation System (Bio-Rad) se analizaron con el *software* Bionumerics (Version 4.5, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

Los subtipos obtenidos por PFGE (pulsotipos) se designaron con la letra S y un número identificativo de los perfiles obtenidos con *AscI* y *ApaI*. En determinados casos, este número se acompañó de un segundo número precedido por un guión para identificar diferentes perfiles obtenidos con *ApaI* de un mismo perfil *AscI*. Los patrones de restricción diferentes se compararon con los que se encuentran en la base de datos *Food Microbe Tracker* (<http://www.foodmicrobetracker.com>).

El dendrograma de los perfiles de PFGE obtenidos con *AscI* y *ApaI* se realizó según el método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA,

unweighted pair group method with arithmetic mean), aplicando el coeficiente de Dice con una tolerancia máxima del 1.5% y una optimización del 0.5% (Ryley 2004).

Criterios de persistencia, “supervivencia” y diversidad genética de los pulsotipos

Los pulsotipos de *L. monocytogenes* detectados en el ambiente o los equipos de forma repetida (tres o más veces) durante un periodo mínimo de tres meses, se consideraron persistentes (Keto-Timonen *et al.* 2007).

Los pulsotipos detectados tras finalizar el estudio de tres años de la Planta A se consideraron “supervivientes”. La asociación entre distintas variables categóricas y los pulsotipos “supervivientes” se analizó mediante la prueba exacta de Fisher.

La diversidad genética de los pulsotipos se estimó mediante el índice de diversidad de Simpson (*D*), que representa la probabilidad de que dos aislados con distintos orígenes se identifiquen como pulsotipos diferentes (Hunter y Gaston 1988):

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)}{N(N-1)}$$

N= nº total de aislados, S= nº de pulsotipos, n_i = nº de aislados pertenecientes al pulsotipo *i*.

5.10. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE *L. MONOCYTOGENES* EN UN MODELO DE FERMENTACIÓN DE CHORIZO IBÉRICO

5.10.1. Cultivos bacterianos y condiciones de crecimiento

Se utilizaron cuatro cepas de *L. monocytogenes* de diferente serotipo molecular, procedentes de productos cárnicos de la Planta A (tabla 6). El crecimiento de las cepas se realizó en BHI a 20 °C durante 48 h. Los cultivos se mantuvieron a 7 °C hasta la preparación de un inóculo mixto con 2×10^5 CFU/ml de cada cepa de *L. monocytogenes*.

Se seleccionaron dos cultivos bioprotectores con propiedades anti-*Listeria* conocidas: *Lactobacillus sakei* CTC494 (tabla 1), organismo productor de sakacina K (Hugas *et al.* 1995), y el estárter comercial Bactoferm™ F-LC (Chr. Hansen A/S) que contiene *Pediococcus acidilactici* (productor de pediocina), *Lactobacillus curvatus* (productor de bavaricina), y *Staphylococcus xylosus*. Las condiciones de empleo y almacenamiento de

L. sakei CTC494 fueron las descritas en trabajos previos (Hugas *et al.* 1995), y las de Bactoferm F-LC, las recomendadas por el fabricante.

5.10.2. Elaboración, inoculación e incubación de las masas de embutido

A partir de carne fresca picada de cerdo ibérico con el resto de ingredientes con los que se elabora el chorizo ibérico (tabla 3), se preparó una masa de embutido que se dividió en tres lotes de 400 g, dos de los cuales se inocularon con los cultivos protectores *L. sakei* CTC494 (M2) y BactofermTM F-LC (M3) y el restante, no inoculado, se empleó como control (M1). Los tres lotes se mezclaron mecánicamente, se envasaron al vacío y se almacenaron a 4 °C.

Tabla 3. Composición de la masa de embutido elaborada para comparar el efecto de dos cultivos protectores sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Ingredientes	% en peso
Carne de cerdo ibérico	93.5
NaCl	3.3
Dextrosa	0.6
Pimentón (origen: Extremadura)	1.64
Ajo	0.56
Orégano	0.17
Citrato trisódico	0.05
Ascorbato sódico	0.005
Nitrito sódico	0.02
Nitrato potásico	0.005
Aceite de oliva	0.15

Cada lote se dividió en cuatro porciones de 100 g (muestras por duplicado para dos temperaturas diferentes), que se inocularon con la mezcla de cepas de *L. monocytogenes*. Las masas inoculadas se mezclaron en un homogeneizador Stomacher 400 (Seward Ltd.) durante 120 s, y se incubaron a 7 °C ó 20 °C durante 24 h. A continuación, la temperatura se mantuvo a 7 °C durante 13 días en ambos casos. Las temperaturas se controlaron de forma continua mediante registradores de temperatura TomProbe® (AES).

5.10.3. Toma de muestras y análisis

De cada masa inoculada, se tomaron muestras de 10 g en los días 0, 1, 2, 3, 7 y 14 del ensayo. Las muestras se transfirieron a bolsas estériles de Stomacher con filtro, donde, tras añadir 10 ml de agua peptonada, se homogeneizaron durante 30 s y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 s, según el método de recuento de *Listeria monocytogenes* ISO 11290-2 (ISO 1998). A continuación se recogieron 5 ml de las suspensiones a través del filtro de las bolsas de Stomacher para eliminar las partículas de carne, y se transfirieron a tubos estériles para realizar los análisis. El pH de las muestras se midió con un pHmetro Crison GLP 22. Los recuentos de *L. monocytogenes* se realizaron en CHROMagar™ *Listeria*. El límite de detección fue 20 CFU/g. De las placas procedentes de los recuentos del inicio y del final del estudio, se seleccionó un número determinado de colonias con las que se realizó la PCR multiplex de identificación del serotipo molecular.

5.10.4. Análisis estadístico de los resultados

Se realizaron dos ensayos independientes, con masas de carne elaboradas en diferentes fechas, y en cada ensayo se llevaron a cabo los análisis por duplicado ($n = 2 \times 2$). Los resultados se representaron como la media de las cuatro determinaciones. La prueba de la *t* de Student desapareada se empleó para determinar diferencias significativas en los recuentos de *Listeria* comparando cada cultivo protector frente al control, o los recuentos del día 14 frente al día 0 para cada uno de los cultivos protectores. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5.11. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *L. MONOCYTOGENES*

5.11.1. Determinación cualitativa de la actividad hemolítica y fosfolipasa C

La actividad de tres proteínas asociadas a la virulencia de *L. monocytogenes* (la hemolisina LLO, la fosfolipasa C de fosfatidil inositol PI-PLC y la fosfolipasa C de fosfatidil colina PC-PLC) se determinó cualitativamente en medios de cultivo sólidos diferenciales.

La actividad hemolítica de las diferentes cepas se comparó midiendo el tamaño del halo de hemólisis desarrollado alrededor del crecimiento bacteriano en agar sangre, y las actividades PI-PLC y PC-PLC se determinaron por los tamaños de los halos de

opacidad desarrollados en CHROMagarTM*Listeria* (Reissbrodt 2004) y CEYM (Ermolaeva *et al.* 2003), respectivamente. Las cepas de *L. monocytogenes* se cultivaron en TSYEB durante 24 h, y se inocularon gotas de 5 µl de estos cultivos líquidos sobre los tres medios sólidos, que, a continuación, se incubaron a 37 °C durante 48 h.

La capacidad de detección de las actividades fosfolipasa C de los medios cromogénicos CHROMagarTM*Listeria*, RAPIDTML.monoTM y BrillianceTM*Listeria*, se comparó utilizando inóculos estandarizados de diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Las placas de los tres medios se incubaron a 37 °C, y se evaluaron las diferencias de morfología, color y halos de opacidad de las colonias a las 24 y 48 h.

5.11.2. Determinación cuantitativa de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica se determinó cuantitativamente mediante la medida de la densidad óptica a 543 nm (OD₅₄₃) de la hemoglobina liberada por eritrocitos de cordero al incubarlos con sobrenadantes de cultivos (en BHI) de las cepas de *L. monocytogenes* (Stoll *et al.* 2008). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro para placas (Thermo). Se incluyeron como controles una suspensión de eritrocitos incubados con agua destilada estéril (OD₅₄₃ próxima a 2.0) y una suspensión de eritrocitos incubados con medio BHI (OD₅₄₃ inferior a 0.1). Se realizaron tres medidas independientes de la actividad LLO de cada cepa, y se calculó la media de los tres ensayos.

En el análisis fenotípico de los factores de virulencia se emplearon como controles positivos tres cepas de *L. monocytogenes* (EGD-e, Scott A, y P14-A), y como control negativo la cepa tipo de *L. monocytogenes* ATCC 15313T (tabla 1).

5.12. ENSAYOS DE MOVILIDAD, CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y FORMACIÓN DE *BIOFILM*

5.12.1. Determinación de la movilidad

La movilidad de las cepas de *L. monocytogenes* se analizó en placas de Petri con BHI semisólido. Las cepas se cultivaron inicialmente en tubos con BHI, a 30 °C durante 18 h, sin agitación. Tras inocular por duplicado 2 µl de los cultivos sobre el BHI semisólido, las placas se sellaron y se incubaron a 30 °C en oscuridad durante 48 h. De cada cepa se realizaron tres ensayos en días independientes, y en todos ellos se incluyó como control *L. monocytogenes* Scott A (Briers *et al.* 2011) (tabla 1). La media del diámetro de las colonias desarrolladas en la superficie del BHI semisólido se consideró

el valor de la movilidad de cada cepa (Di Bonaventura *et al.* 2008) y el resultado se expresó como el porcentaje de movilidad respecto a la cepa control que se consideró el 100%.

5.12.2. Determinación de la capacidad de adhesión (*biofilm* de 48 h)

La capacidad de adhesión (medida como el *biofilm* de 48 h) se determinó mediante un ensayo de tinción del *biofilm* con cristal violeta en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner BioOne) con medio sTSYEB (Djordjevic *et al.* 2002, Pan *et al.* 2010). Las microplacas, inoculadas con 10^6 CFU/ml de cada cepa, se incubaron estáticamente a 37 °C durante 48 h. Tras su incubación, las microplacas se lavaron cinco veces con agua destilada estéril (300 µl/pocillo), y se secaron al aire durante 45 min. La tinción de los *biofilms* se realizó con una solución acuosa de cristal violeta (Sigma-Aldrich) al 0.8% (200 µl/pocillo), a temperatura ambiente durante 45 min. Después de realizar cinco lavados con agua del grifo y secar completamente las microplacas, los *biofilms* se destiñeron con etanol al 95% (200 µl/pocillo) durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución del cristal violeta destiñido medida en un espectrofotómetro para placas (Thermo) a una longitud de onda de 580 nm (OD_{580}), se consideró la capacidad de adhesión. Con cada cepa se realizaron tres ensayos independientes, y en cada uno de ellos se incluyeron seis réplicas idénticas ($n = 18$). La capacidad de adhesión de cada cepa se expresó como el porcentaje de adhesión respecto al valor obtenido con la cepa control *L. monocytogenes* Scott A (Briers *et al.* 2011) (tabla 1) que se consideró el 100%.

5.12.3. Determinación del *biofilm* de siete días

La evaluación de la adhesión y posterior formación de *biofilm* en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio (BAC) (de 0.07 a 40 mg/l) se llevó a cabo mediante un ensayo igual al anterior [Determinación de la capacidad de adhesión (*biofilm* de 48 h)], prolongando la incubación a 37 °C hasta completar 7 días. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la reducción del *biofilm* debida al BAC, en comparación con el control sin BAC que se consideró el 100%.

5.12.4. Medida del crecimiento de *L. monocytogenes* en el medio de formación de *biofilm*

Para determinar el crecimiento de cada cepa de *L. monocytogenes* en sTSYEB, los cultivos se inocularon en microplacas Bioscreen C de 200 pocillos, que se incubaron a

37 °C durante 24 h en un lector de turbidez Bioscreen C (Oy Growth Curves AB). La densidad óptica se midió cada 60 min a una longitud de onda de 600 nm (OD_{600}). La medida del crecimiento se expresó, por un lado, como la densidad celular (OD_{600} a las 24 h) y, por otro lado, como la tasa máxima de crecimiento específico [$\mu(OD_{600})$]. La tasa máxima de crecimiento específico se estimó a partir de los datos de la turbidez mediante el modelo de Baranyi y Pin (1999), con el programa DMFit (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). Con cada cepa se realizaron tres ensayos independientes, y en cada uno de ellos se incluyeron seis réplicas idénticas ($n = 18$) para determinar las medias de la densidad celular y la tasa máxima de crecimiento específico.

5.12.5. Análisis estadístico de los resultados

La interdependencia de las cifras de movilidad y adhesión de cada pulsotipo se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias de movilidad o capacidad de adhesión entre pulsotipos se determinaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Igualmente, se empleó el análisis de la varianza para identificar asociaciones estadísticamente significativas entre la movilidad o la capacidad de adhesión de cada cepa y diferentes caracteres cualitativos que se indican en la tabla 8. Las diferencias entre medias fueron analizadas con la prueba de la t de Student para dos muestras. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con una $P < 0.05$. Todos los cálculos se llevaron a cabo mediante Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) y Minitab 16 Statistical Software (Minitab Inc.).

5.13. ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

5.13.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

5.13.1.1. Técnica de difusión en agar

La sensibilidad a los antibióticos se determinó mediante el Etest® (AB Biomérieux, www.abbiobioscience.se/bd_litt_etm.html). Se utilizaron placas de agar Mueller Hinton, y se siguieron las recomendaciones del fabricante de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC (<http://www.seimc.org>). Se seleccionaron 12 antibióticos (tabla 10) de las principales clases de agentes activos frente a bacterias Gram-positivas (incluidos los empleados para el tratamiento de la listeriosis humana). La selección se basó en las recomendaciones de la Mesa Española para la

Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA 2000).

Se llevaron a cabo dos determinaciones independientes y en todos los ensayos se incluyeron como controles de calidad dos cepas recomendadas por el Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos de EE. UU. (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (CLSI 2012): *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 (control para los antimicrobianos activos frente a bacterias Gram-positivas) y *Enterococcus faecalis* ATTC 29212 (control para los antimicrobianos activos frente a bacterias Gram-positivas, y, en general, para el trimetoprim/sulfametoxazol) (tabla 1). Para definir a una cepa como sensible o resistente a un antibiótico se comparó su MIC con los puntos de corte de sensibilidad-resistencia definidos por el comité EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) para *L. monocytogenes* (o para *Staphylococcus spp.* en aquellos antimicrobianos con los que no se han definido los puntos de corte para *L. monocytogenes*) (EUCAST 2013).

5.13.1.2. Técnica de dilución en agar

Todos los antimicrobianos se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se prepararon y almacenaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las MICs de cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de cadmio, bromuro de etidio (EtBr), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), clorhexidina, cloranfenicol, ciprofloxacino, eritromicina y gentamicina, se determinaron mediante un método de dilución en agar, empleando placas con agar Mueller Hinton (CLSI 2008). Los inóculos se prepararon con 10^6 CFU/ml en agua peptonada y se inocularon gotas de 5 μ l sobre la superficie de las placas, que a continuación se incubaron a 37 °C durante 24 h protegidas de la luz. La MIC se definió como la concentración más baja que impedía el crecimiento. Las MICs se determinaron, como mínimo, en dos ensayos independientes, incluyendo en cada ensayo las cepas por duplicado. En todos los ensayos se incluyeron como controles las cepas de *L. monocytogenes* EGD-e y Scott A (tabla 1).

En este estudio se consideró una cepa resistente si la MIC de un compuesto era más alta que la de las cepas de referencia de las colecciones de cultivos, por ej. *L. monocytogenes* EGD-e, ensayadas en paralelo (Gilbert y McBain 2003). En el caso del BAC, la resistencia se definió también como “estable” y de “bajo nivel”, lo que significaba que la resistencia no era un carácter reversible y que las cepas resistentes

solo mostraban un aumento de 4 a 16 veces en su MIC en comparación con el resto de las cepas (To *et al.* 2002, Kastbjerg y Gram 2012). Los fenotipos de resistencia/susceptibilidad a BAC se expresan abreviadamente en este estudio como BAC^R en el caso de la resistencia (MIC de 10-20 mg/l) y BAC^S en el caso de la sensibilidad (MIC de 1.25-2.5 mg/l).

Determinación del efecto de la reserpina sobre las MICs de BAC

De forma idéntica a lo descrito en el apartado anterior, se determinaron las MICs de BAC en presencia de reserpina, un inhibidor de las bombas de expulsión de tóxicos (Rakic-Martinez *et al.* 2011). La reserpina (Sigma-Aldrich), a una concentración fija de 10 mg/l, se añadió a las placas de agar Mueller Hinton con diferentes concentraciones de BAC.

5.13.2. Viabilidad de las células de *L. monocytogenes* en presencia de cloruro de benzalconio

La viabilidad de las células de *L. monocytogenes* en presencia de concentraciones subinhibitorias de BAC, se determinó en tubos con agua peptonada con diferentes concentraciones de BAC (10, 5, 2.5, 1.25, y 0.6 mg/l). Los inóculos se ajustaron a 10⁶ CFU/ml y, tras la inoculación, los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, el desinfectante se neutralizó con una solución de agua peptonada con lecitina (0.07%) y Tween 80 (0.5%) (Langsrud y Sundheim 1998), que se dejó actuar a 37 °C durante 10 min. Tanto la lecitina como el Tween 80 se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las células se resuspendieron mediante agitación, y se realizó el recuento de CFU de las bacterias supervivientes en placas con TSYEA, que se incubaron a 37 °C durante 48 h.

5.14. DETECCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTENCIA A CLORURO DE BENZALCONIO

5.14.1. Genes *qacH* y *radC* asociados al transposón Tn6188

Para la detección del transposón Tn6188, se llevaron a cabo dos PCRs en las que se emplearon dos parejas de cebadores específicos (tabla 2), una para el gen de resistencia *qacH* del propio transposón, y otra para el gen cromosómico *radC* en el que está insertado el transposón (Müller *et al.* 2013). Ambas reacciones se llevaron a cabo en las

condiciones descritas por Müller *et al.* (2013) y se incluyó como control positivo la cepa *L. monocytogenes* 4423 (tabla 1) (Müller *et al.* 2013).

5.14.2 Determinante genético *bcrABC*

La detección del determinante de resistencia *bcrABC* se llevó a cabo mediante una reacción de PCR en la que se empleó una pareja de cebadores específicos (tabla 2) y en unas condiciones descritas previamente (Elhanafi *et al.* 2010). Se incluyó como control positivo la cepa *L. monocytogenes* CDL69 (tabla 1) (Müller *et al.* 2013).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS RUTAS DE CONTAMINACIÓN Y PATRONES DE PERSISTENCIA DE *L. MONOCYTOGENES* EN LA PLANTA A

6.1.1 Detección de *L. monocytogenes*

A lo largo de tres años se analizó la presencia de *L. monocytogenes* en una planta de sacrificio y procesamiento de productos de cerdo ibérico (Planta A). Durante ese periodo se analizaron 2127 muestras procedentes del ambiente, los equipos, las materias primas y los productos, de las que 398 resultaron positivas (tabla 4). En determinadas muestras positivas se aislaron y analizaron varias colonias (apartado 5.5.1), lo que dio lugar a la identificación de 541 aislados de *L. monocytogenes* procedentes de determinadas etapas del procesamiento y diferentes tipos de productos (figura 1).

Determinadas condiciones de la explotación y el procesamiento industrial del cerdo ibérico, como la alimentación y densidad de población de los animales, las operaciones de despiece de las canales y los periodos de curado-maduración de los productos, presentan diferencias frente a otras razas porcinas. A pesar de ello, los resultados relativos a la contaminación por *L. monocytogenes* obtenidos en este estudio no fueron muy diferentes a los de otras plantas de procesamiento de productos cárnicos de cerdo publicados anteriormente (Thévenot *et al.* 2006a, Choi *et al.* 2013, Meloni *et al.* 2013).

Tabla 4. Prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y en los productos de la Planta A.

Año	Ambiente y equipos			Materias primas y productos		
	Nº de muestras	Nº positivas	% positivas	Nº de muestras	Nº positivas	% positivas
1	166	14	8	471	137	29
2	322	37	11	589	160	27
3	313	24	7	266	26	9
Total	801	75	9	1326	323	24

La contaminación detectada en el ambiente y los equipos tras las operaciones de limpieza y desinfección (con un 9% de muestras positivas y sin variaciones significativas en los tres años, tabla 4), resultó similar a la mostrada por otros estudios (Chasseignaux *et al.* 2001, Gudbjörnsdóttir *et al.* 2004, Kornacki y Gurtler 2007).

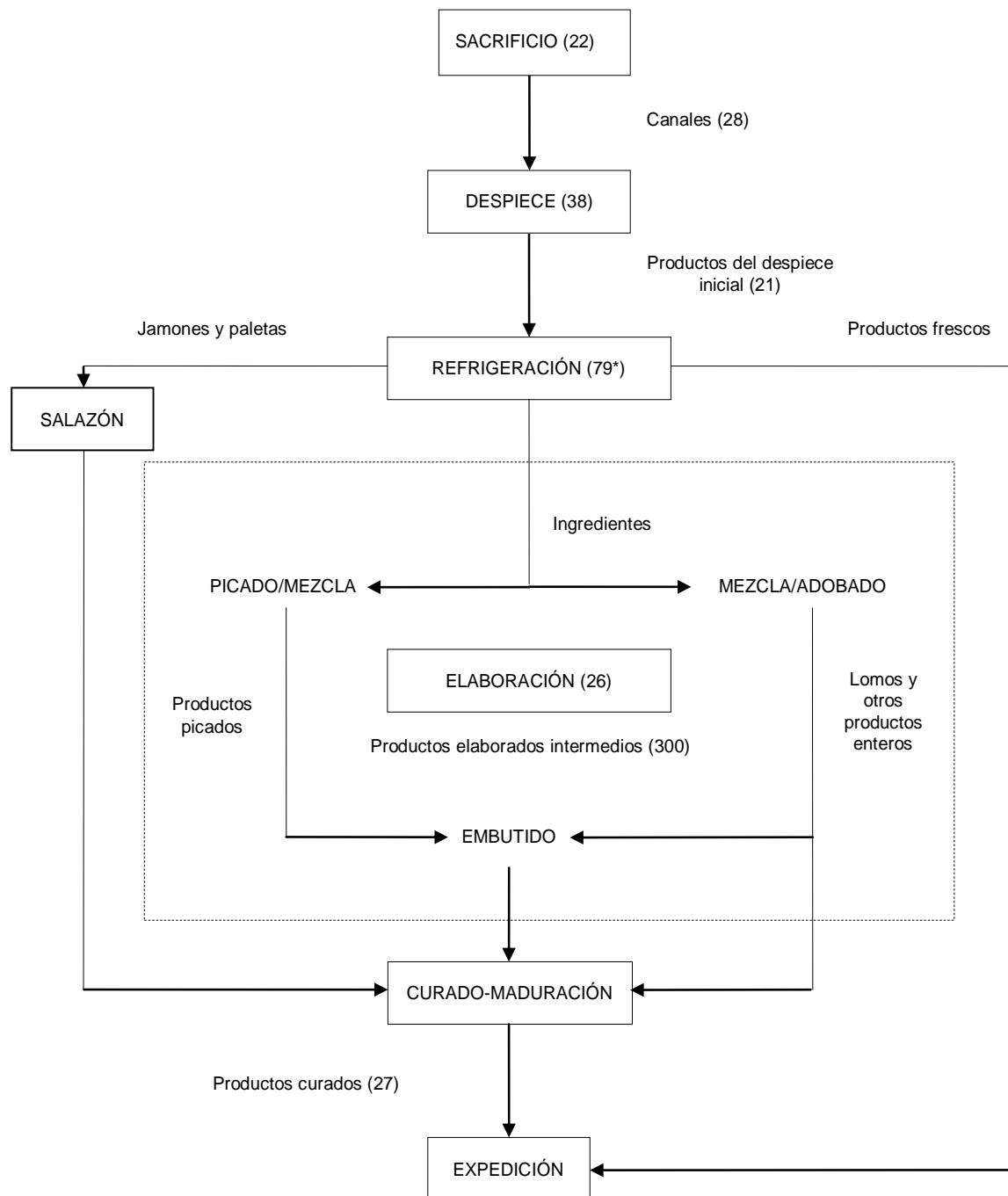


Figura 1. Diagrama de las principales etapas de procesado en la Planta A. Entre paréntesis, número de aislados de *L. monocytogenes* identificados en los tres años. Línea discontinua, obrador. * Incluye cámaras frigoríficas y otras zonas (pasillos, etc.).

L. monocytogenes no se detectó en el ambiente del matadero durante el primer año del estudio, y solo se aisló en las canales a lo largo del segundo año (tabla 5). Este bajo índice de contaminación del matadero resultó semejante al de otros trabajos, que muestran una prevalencia de *Listeria* spp. del 0 al 9% en canales de cerdo, y del 0 al 3% en los equipos de las plantas de sacrificio (Gill y Jones 1995, Farber *et al.* 2007).

El 24 % de las muestras de materias primas y productos resultaron positivas (tabla 4), de forma similar a otras cifras publicadas acerca de la contaminación por *L. monocytogenes* en productos cárnicos (del 12 al 22% en la revisión de Farber *et al.* 2007), si bien, en el presente trabajo la mayor parte de los aislados procedía de productos elaborados intermedios. Menos del 10% de los aislados procedía de productos curados (tabla 5), cuyo nivel de contaminación, a excepción de dos muestras, fue inferior a 10^2 CFU/g.

Tabla 5. Numero de aislados de *L. monocytogenes* identificados a partir de muestras ambientales y de productos de la Planta A.

Año	Ambiente y equipos				Materias primas y productos			
	Matadero	Sala de despiece	Obrador	Otras zonas ^b	Canales	P. del despiece inicial	P. elaborados intermedios	P. curados
1	ND ^a	ND	16	35	ND	11	157	ND
2	8	36	2	21	28	10	115	9
3	14	2	8	23	ND	0	28	18
Total	22	38	26	79	28	21	300	27

^a ND, no detectado. ^b Cámaras de refrigeración/congelación, cámara de salazón, etc.

Con el fin de controlar la contaminación por *L. monocytogenes* en la planta, se aplicaron una serie de medidas correctoras a lo largo del segundo año del estudio. En primer lugar, en el plan de HACCP se estableció como punto de control crítico la evaluación de la contaminación de los ingredientes crudos que, procedentes de la sala de despiece, llegaban al obrador, así como de las carnes picadas, mezcladas y adobadas en el obrador.

En segundo lugar, aumentó el nivel de compartimentalización de la línea de procesado. Se diseñó y construyó una nueva sala de despiece sin acceso directo desde el matadero,

con el fin de prevenir movimientos indeseables del personal y de los equipos entre ambas zonas, lo que probablemente limitó el flujo de *L. monocytogenes* desde el área de sacrificio a la de procesado (Lundén *et al.* 2003b).

Por último, se modificaron los protocolos de limpieza y desinfección. Se realizaron cambios en los procedimientos de limpieza y en las secuencias de aplicación de productos, se incorporaron nuevos productos (agentes de limpieza enzimáticos diseñados para la eliminación de *biofilms*), y se adoptaron nuevos procedimientos de desinfección de los equipos y la maquinaria, prestando especial atención a aquellas superficies y máquinas del obrador que podían resultar fácilmente colonizadas por *L. monocytogenes*.

Estas estrategias de control no provocaron un descenso en las cifras de aislamiento de *L. monocytogenes* del ambiente probablemente debido a la diversidad de los reservorios en que se encontraba, si bien, dieron lugar a una reducción significativa de los productos contaminados durante el tercer año del estudio (tabla 4). La reducción en el ambiente probablemente fue desigual, pero afectó especialmente a la sala de despiece, lo que pudo originar el descenso del porcentaje de productos contaminados.

6.1.2. Subtipos de *L. monocytogenes*

Los 541 aislados de *L. monocytogenes* identificados a lo largo de los tres años del estudio, se analizaron mediante la PCR multiplex de identificación del serotipo molecular (apartado 5.9.1), y mediante PFGE (apartado 5.9.2). De ellos, 165 aislados procedían del ambiente y de los equipos, 28 de canales, 321 de productos no curados y 27 de productos curados (tabla 5). Los productos no curados incluían carnes procedentes del despiece y productos elaborados intermedios (picados o enteros) en los que el proceso de curado-maduración no había concluido.

6.1.2.1. Serotipos moleculares

En esta población de *L. monocytogenes* se identificaron los cuatro serotipos moleculares de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b). De los 541 aislados, 369 pertenecieron al serotipo molecular 1/2a, 116 al serotipo molecular 1/2b, 41 al serotipo molecular 1/2c, y 15 al serotipo molecular 4b (figura 2).

Los serotipos predominantes fueron 1/2a y 1/2b, con el 68 y el 21% de los aislados, respectivamente. Los aislados del serotipo mayoritario 1/2a se detectaron en el ambiente, los equipos y diferentes tipos de productos, y los de serotipo 1/2b se

detectaron principalmente en el ambiente y en productos no curados (tabla 6). El 8% de los aislados perteneció al serotipo 1/2c, que se asoció principalmente con el ambiente del matadero y las superficies de las canales (tabla 6). El serotipo 4b fue el menos frecuente, con un 3% de los aislados, y se detectó exclusivamente en productos no curado-madurados (tabla 6).

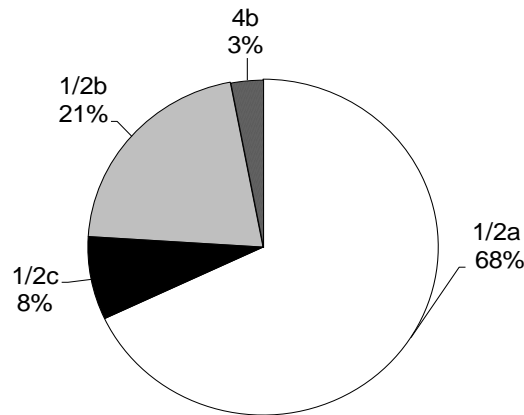


Figura 2. Distribución de los aislados en función de su serotipo molecular.

La identificación de los serotipos suele ser el primer paso en los estudios epidemiológicos sobre *L. monocytogenes*. Actualmente, los aislados de *L. monocytogenes* se pueden agrupar, al menos, en 13 serotipos distintos (Seeliger y Jones 1986), de los cuales cuatro (1/2a, 1/2b y 4b) causan aproximadamente el 95% de los casos de listeriosis humana (McLauchlin 1990, Farber y Perterkin 1991). El estudio de los serotipos con fines epidemiológicos permite una rápida clasificación inicial de los aislados, y tiene una gran importancia por la asociación de determinados serotipos con los brotes de listeriosis. Mientras que la mayoría de los brotes de listeriosis asociados con alimentos y gran parte de los casos esporádicos, son causados por cepas del serotipo 4b (López *et al.* 2007, Little *et al.* 2010), el serotipo 1/2a es el que se aísla con mayor frecuencia en muestras de alimentos y ambientales (Gray *et al.* 2004).

El estudio de los subtipos moleculares y el análisis filogenético ha permitido agrupar las cepas de *L. monocytogenes* en dos grandes grupos genéticos denominados linajes I y II. Estos dos linajes se correlacionan con los serotipos obtenidos con la técnica convencional de aglutinación: el linaje I incluye los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e, y el linaje II incluye los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c. Existen otros dos linajes minoritarios (III y IV) asociados principalmente a casos clínicos de listeriosis animal, dentro de los

cuales pueden agruparse algunos aislados atípicos de serotipo 4b, que han de diferenciarse de los aislados 4b del linaje I que son los asociados con los casos de listeriosis humana (Orsi *et al.* 2011).

La divergencia evolutiva entre los linajes de *L. monocytogenes* ha ocurrido en múltiples genes, algunos de los cuales podrían estar relacionados con su capacidad de supervivencia en nichos específicos (Call *et al.* 2003, Severino *et al.* 2007). En un estudio llevado a cabo por Gianfranceschi *et al.* (2003), los serotipos 1/2a y 1/2c (linaje II) predominaron entre los aislados procedentes de carne, productos cárnicos y el ambiente de plantas de procesamiento de carne. En otros estudios, sin embargo, los aislados procedentes de la carne fresca o el ambiente del procesamiento se agrupan casi exclusivamente dentro del linaje I (serotipos 1/2b y 4b) (Heir *et al.* 2004, López *et al.* 2008).

En este trabajo, el 76% de los aislados se encuadró en el linaje II, con un número especialmente elevado de aislados de serotipo 1/2a (el 68% del total) (figura 2). Los aislados 1/2a predominaron durante los tres años en el ambiente del área de elaboración (obrador) y en los productos elaborados (tabla 6), lo que indica que podría tratarse de cepas capaces de adaptarse especialmente a este ambiente y colonizarlo. Aunque las razones del predominio del serotipo 1/2a no pueden determinarse, las cepas de este serotipo han mostrado en diversos trabajos una mayor capacidad de formación de *biofilm* que las de otros serotipos (Borucki *et al.* 2003, Pan *et al.* 2010, Nilsson *et al.* 2011).

6.1.2.2. Pulsotipos

La identificación de los subtipos de los 541 aislados de *L. monocytogenes* mediante PFGE se llevó a cabo según el protocolo de *PulseNet* (Graves y Swaminathan 2001, Halpin *et al.* 2010), que emplea las enzimas *AscI* y *ApaI* para la digestión del DNA.

El análisis con la enzima *AscI* dio lugar a 21 perfiles de restricción, que se nombraron con la letra S y un número, del 1 al 21. El análisis con la enzima *ApaI* dio lugar a 29 perfiles diferentes, y subdividió algunos de los perfiles obtenidos con *AscI*, a los que se asignó un segundo número tras un guión para representar las variantes obtenidas con *ApaI* para un único perfil *AscI* (por ejemplo, S4-1 representa la variante 1 obtenida con *ApaI* del perfil S4 generado con *AscI*). Entre los aislados con el perfil S7 se identificaron cuatro perfiles *ApaI* diferentes, entre los del perfil S4 se identificaron

tres, y entre los de S10, S17 y S20, se identificaron dos. A los 24 perfiles de *AscI* restantes se les asoció un único perfil *ApaI*.

Los resultados obtenidos con las dos endonucleasas coincidieron con los presentados en otros trabajos (Fugget *et al.* 2007), e indican que el análisis con *ApaI* suele ser más discriminatorio que el análisis con *AscI* al diferenciar un mayor número de subtipos.

El análisis combinado de los perfiles *AscI* y *ApaI* permitió la clasificación de los 541 aislados de *L. monocytogenes* en 29 pulsotipos (o cepas genéticamente diferentes), y confirma una vez más la PFGE como la técnica más idónea para identificar los subtipos de esta especie, como muestran numerosos estudios de brotes de listeriosis (Kathariou *et al.* 2006, Laksanalamai *et al.* 2012).

Todos los aislados con el mismo perfil de PFGE pertenecieron al mismo serotipo molecular (figura 3). Si ocurriesen cambios en los genes responsables del serotipo en alguno de los aislados con un mismo perfil de PFGE, éstos podrían presentar diferentes serotipos. De hecho, en un trabajo de Neves *et al.* (2008a) se identificaron aislados de diferente serotipo con el mismo perfil de PFGE, si bien, estos autores puntualizaron que la PFGE solamente permite agrupar los pulsotipos de los cuatro serotipos moleculares pero no los 13 serotipos convencionales.

El dendrograma obtenido por el método UPGMA reflejó una clara separación de los 29 pulsotipos en los dos grupos genéticos principales en que se divide *L. monocytogenes*, el linaje I (serotipos 1/2b y 4b) y el linaje II (serotipos 1/2a y 1/2c), con un grado de similitud entre ellos inferior al 40% (figura 3). Este agrupamiento de los 29 pulsotipos en dos bloques basados en la distribución de los serotipos y los linajes genéticos I y II, coincide con resultados previos (Brosch *et al.* 1994, López *et al.* 2008). Asimismo, la menor similitud de los pulsotipos enmarcados en el linaje II (figura 3) coincide con los resultados de otros trabajos, que muestran una menor clonalidad de este linaje respecto al linaje I (Meinersmann *et al.* 2004, den Bakker *et al.* 2008, Orsi *et al.* 2008).

Tabla 6. Subtipos moleculares identificados en la Planta A.

Pulsotipo	Serotipo molecular	Nº aislados			Persistencia ^a	Zona ^b	Muestras de superficies ^c			Muestras de productos ^c			
		Año 1	Año 2	Año 3			Ambiente	Equipos	Canales	P. no curados			P. curados
										P. despiece inicial	P. elaborados enteros	P. elaborados picados	
S1	1/2a	107	82	55	+	D, O	41	10	-	4	134	38	17
S2-1	1/2a	32	51	6	+	M, D	20	1	7	4	18	33	6
S3	1/2a	2	2	-		M, D	1	-	1	-	2	-	-
S4-1	1/2b	32	20	10	+	M, D, O	28	4	5	5	8	12	-
S4-2	1/2b	14	14	-	+	D	14	2	1	-	4	5	2
S4-3	1/2b	4	10	2	+	D	7	4	-	-	3	2	-
S5	1/2c	5	19	3	+	M, D, O	9	2	6	2	9	-	-
S6	1/2a	1	-	-			1	-	-	-	-	-	-
S7-1	4b	4	2	-			-	-	-	2	-	4	-
S7-2	4b	1	4	-			-	-	-	2	-	3	-
S7-3	4b	-	1	-			-	-	-	-	-	1	-
S7-4	4b	-	1	-			-	-	-	-	-	1	-
S8	1/2c	1	1	-		M	-	-	-	-	-	2	-
S9	4b	-	2	-			-	-	-	-	-	2	-
S10-1	1/2a	-	3	20	+	M, D	12	-	-	-	11	-	-
S10-2	1/2a	-	1	-			-	-	1	-	-	-	-
S11	1/2a	-	1	-			-	-	-	1	-	-	-
S12	1/2c	-	7	4		M, D	2	-	7	-	-	-	2
S13	1/2b	-	2	-			-	-	-	-	-	2	-
S14	1/2a	-	2	-			-	-	-	-	1	1	-
S15	1/2a	-	1	-			-	-	-	1	-	-	-
S16	1/2a	-	1	-			-	-	-	-	-	1	-
S17-1	1/2b	-	1	3	+	D	3	-	-	-	-	1	-
S17-2	1/2b	-	1	-			-	-	-	-	-	1	-
S18	1/2b	-	1	-			-	-	-	-	-	1	-
S19	1/2a	-	-	2		D	2	-	-	-	-	-	-
S20-1	1/2b	-	-	1			1	-	-	-	-	-	-
S20-2	1/2b	1	-	-			-	-	-	-	1	-	-
S21	1/2c	-	1	-		O	1	-	-	-	-	-	-

^a +, pulsotipo persistente. ^b Presencia en las zonas principales de la planta: M, matadero; D, sala de despiece; O, obrador. ^c Origen de los aislados.

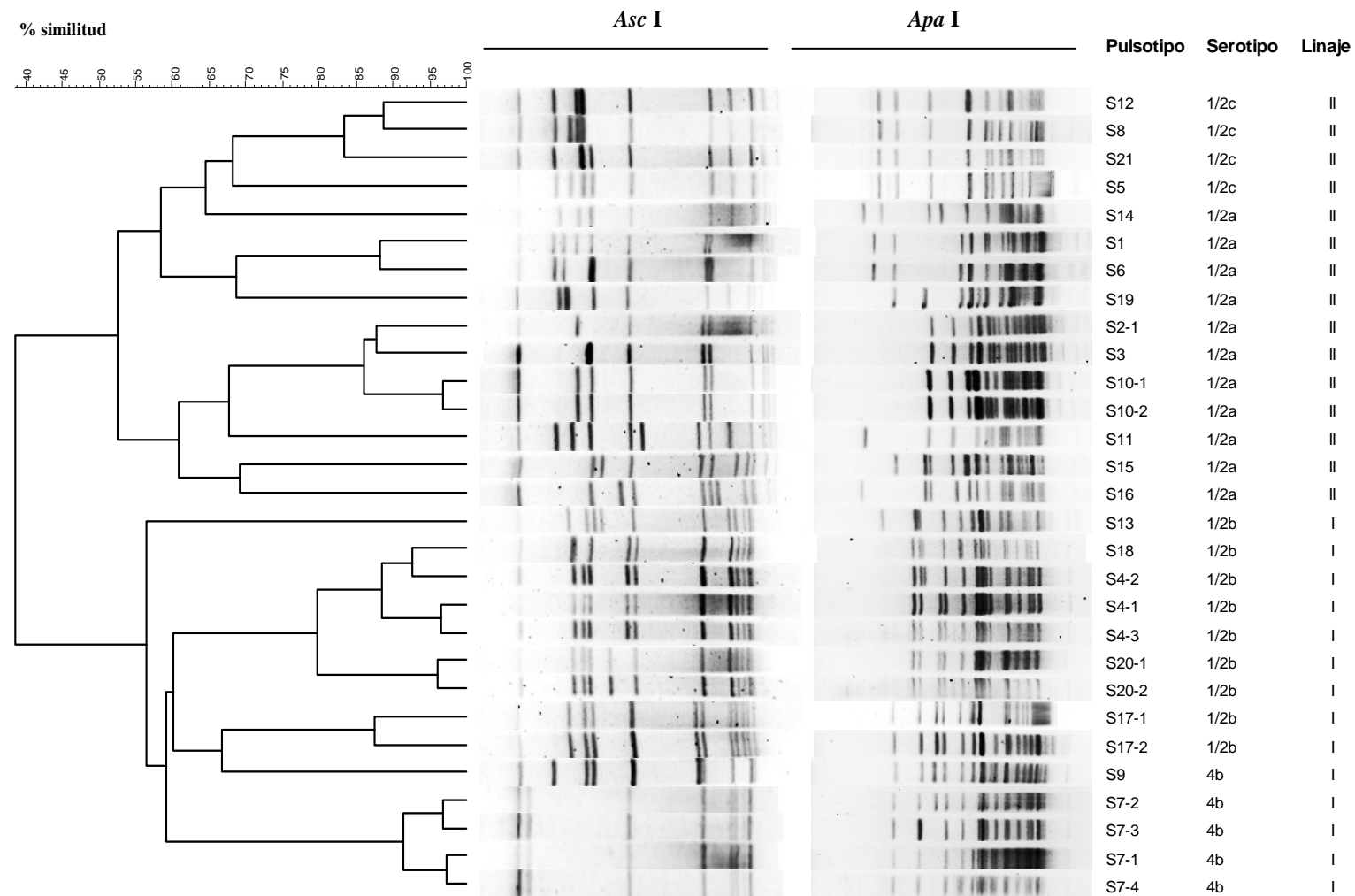


Figura 3. Dendrograma de los 29 pulsotipos identificados en la Planta A.

6.1.3. Diversidad genética de los subtipos identificados

La diversidad genética de los 29 pulsotipos obtenidos con *AscI* y *ApaI* se estimó mediante el índice de diversidad de Simpson (apartado 5.9.2), con el que se obtuvo un valor de 0.749.

En 2007, Fugett *et al.* realizaron un estudio de diversidad genética de los pulsotipos de *L. monocytogenes* identificados en poblaciones de distintos orígenes, en el que el análisis por PFGE con *AscI* y *ApaI* presentó un alto poder discriminatorio, definido por un índice de diversidad de Simpson de 0.995. Según el valor obtenido en nuestro estudio, se puede considerar que la diversidad genética del conjunto de 541 aislados de *L. monocytogenes* obtenidos durante tres años en esta planta es relativamente baja, similar a la observada en otras plantas de procesamiento de cerdo (Giovannacci *et al.* 1999, Chasseignaux *et al.* 2001, Lundén *et al.* 2003b), e indica la existencia de una población de *L. monocytogenes* ampliamente extendida, formada por un número reducido de cepas muy relacionadas genéticamente, ubicadas en diferentes áreas de las instalaciones analizadas.

6.1.4. Patrones de contaminación

6.1.4.1. Pulsotipos persistentes

Atendiendo al criterio empleado en estudios previos sobre la persistencia de *L. monocytogenes* (apartado 5.9.2), ocho de los 29 pulsotipos (representantes del 91% de los aislados) se consideraron persistentes en la Planta A durante el periodo de estudio (tabla 6).

Los ocho pulsotipos persistentes se detectaron en las principales zonas de la planta. En el matadero se identificaron cuatro de ellos (S2-1, S4-1, S5 y S10-1). En el ambiente y los equipos de la sala de despiece se aislaron los ocho, dos de los cuales (S4-3 y S17-1) se encontraron exclusivamente en esta zona. En el obrador, donde se detectaron tres pulsotipos persistentes (S1, S4-1 y S5), algunas líneas de producción resultaron contaminadas persistentemente, como la línea de producción de lomos en la que *L. monocytogenes* se aisló repetidamente en una máquina adobadora.

De los 21 pulsotipos restantes, 17 estaban representados solamente por uno o dos aislados (tabla 6), procedentes en su mayoría de canales y productos elaborados no curados en los que la diversidad de cepas esporádicas detectada podría ser el resultado de la variedad de materias primas empleadas en el proceso de elaboración.

De los 541 aislados identificados, 321 (el 60% del total) procedían de productos intermedios y entre ellos se detectaron 25 pulsotipos, incluidos los ocho pulsotipos persistentes. Sólo 27 aislados (el 4%) procedían de productos curados y pertenecieron a cuatro pulsotipos, tres de ellos persistentes (S1, S2-1 y S4-2) (tabla 6).

Los resultados anteriores muestran patrones diferentes de contaminación en las principales zonas de la planta, con un número limitado de pulsotipos persistentes junto a un grupo diverso de cepas detectadas de forma esporádica en el ambiente y los productos, e indican que la identificación de subtipos o discriminación entre aislados constituye una herramienta fundamental en el control de la contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes*.

6.1.4.2. Pulsotipos predominantes

Los pulsotipos que representaban más del 10% de los aislados se consideraron arbitrariamente “predominantes”. Según este criterio, los pulsotipos persistentes S1, S2-1 y S4-1 (que suponían en conjunto el 73% de los aislados) resultaron predominantes.

S1 fue el pulsotipo mayoritario, con 244 aislados (el 45% del total). Este pulsotipo no se detectó en el ambiente del matadero ni en las canales y resultó, en cambio, el pulsotipo predominante en la planta de procesado, en particular en el obrador donde el 92% de los aislados perteneció a este pulsotipo y se detectó durante los tres años (figura 4a). Fue también el pulsotipo más abundante entre los productos (193 aislados), y se aisló mayoritariamente a partir de productos elaborados intermedios enteros (134 aislados) (tabla 6). La distribución ambiental del pulsotipo S1 en la sala de despiece y en el obrador, indica que la predominancia de este pulsotipo en los productos elaborados podría deberse a focos de contaminación localizados en las zonas posteriores al sacrificio.

S2-1 fue el segundo pulsotipo más abundante, con 89 aislados (el 16%). La contaminación ambiental por este pulsotipo se detectó sólo durante el segundo año del estudio, y se limitó a las áreas de sacrificio (donde se aisló también en canales) y de despiece (figura 4b). Aunque S2-1 no se detectó en el obrador, se aisló a partir de productos en 61 ocasiones, mayoritariamente a partir de productos elaborados intermedios, sobre todo picados (tabla 6).

S1 y S2-1 fueron los pulsotipos predominantes entre los aislados procedentes de productos. La presencia de estos dos pulsotipos en el ambiente de la sala de despiece, y

la ausencia de S1 en el matadero y de S2-1 en el obrador, indican que la contaminación predominante de los productos podría proceder de la contaminación de la carne fresca o el ambiente donde ésta se manipulaba, aunque la llegada de estos pulsotipos a la sala de despiece podría tener diferentes orígenes. Por otro lado, la presencia de S1 y S2-1 en los productos curados muestra la supervivencia de estos pulsotipos durante todo el procesado, incluida la etapa de curado.

El pulsotipo S4-1, al que pertenecían 62 aislados (el 11% de los aislados identificados), se detectó irregularmente en el ambiente del matadero y el área de procesado a lo largo de los tres años (figura 4c). Durante el primer año, este pulsotipo se aisló en aguas procedentes de los sumideros del obrador y en una máquina picadora, lo que sugiere una probable asociación de dicha máquina con la contaminación de los productos picados en ese periodo (tabla 6). Durante el segundo año, S4-1 se detectó en la sala de despiece y en las superficies de algunas canales en el matadero, y durante el tercero en el ambiente y los equipos de limpieza del matadero. Todos los aislados de productos (25 en total) se identificaron en productos elaborados intermedios, enteros y picados (tabla 6), y se detectaron durante los dos primeros años (el 85% durante el primero, y el 15% durante el segundo). La ausencia de S4-1 en el ambiente del área de procesado y en los productos durante el tercer año, y su presencia en el ambiente del matadero durante ese periodo, podrían estar relacionadas con las medidas de compartimentalización adoptadas durante el año anterior, que independizaron el área de procesado de la de sacrificio.

La distribución de S1, S2-1 y S4-1 en el ambiente y en los productos, generó patrones de contaminación específicos de cada pulsotipo, con diferentes respuestas a las medidas correctoras adoptadas en la planta, confirmando la importancia de la identificación de subtipos o cepas que permitan adoptar soluciones específicas para controlar la contaminación.

Estos tres pulsotipos persistieron en el ambiente a lo largo del periodo de estudio, lo que indica que se trataba de cepas afincadas en esta planta, que podrían haberse adaptado a su ambiente siendo capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse allí. Especialmente destacable es el caso del pulsotipo S1, aislado del ambiente del obrador y los productos elaborados en él durante todo el periodo de estudio, lo que sugiere como reservorio de esta cepa alguna/s superficie/s del obrador en contacto con los productos que no se ha logrado identificar.

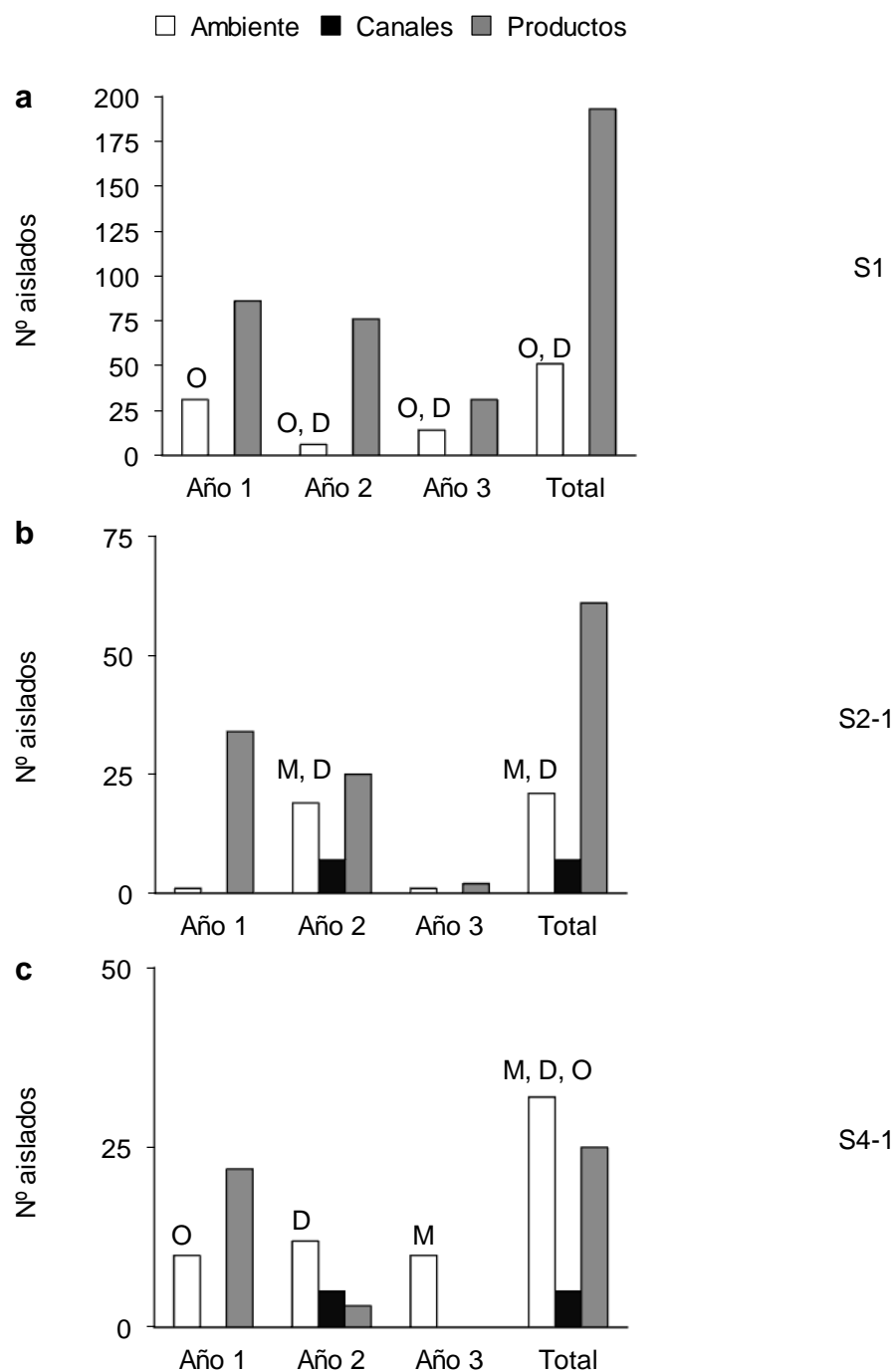


Figura 4. Distribución de los aislados de los pulsotipos predominantes. Presencia de los tres pulsotipos S1 (a), S2-1 (b) y S4-1 (c), en las principales zonas de la planta (M, matadero; D, sala de despiece; O, obrador).

Existen varias posibilidades que podrían explicar la predominancia de estas cepas (Wulff *et al.* 2006): (a) Que estas cepas fuesen más frecuentes que otras cepas, o las primeras en colonizar el ambiente de procesado. (b) Que fuesen más competitivas debido a tasas de multiplicación más altas. (c) Que fuesen mejores colonizadoras debido, por ejemplo, a una mayor capacidad para adherirse a las superficies o formar *biofilm*. (d) Que mostrasen una mayor resistencia a los desinfectantes, bien por características propias del *biofilm*, como la matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), o bien por características intrínsecas a las células, como su MIC (Heir *et al.* 2004, Pan *et al.* 2006).

6.2. VIABILIDAD DE DIFERENTES CEPAS DE *L. MONOCYTOGENES* AISLADAS EN LA PLANTA A, EN UN MODELO DE FERMENTACIÓN DE CHORIZO IBÉRICO ELABORADO CON DIFERENTES CULTIVOS PROTECTORES

Con objeto de determinar la eficacia del empleo de cultivos protectores en la elaboración de los embutidos ibéricos curados, se analizó la viabilidad de un grupo de cepas de *L. monocytogenes* de diferente serotipo molecular, aisladas repetidamente a partir de productos frescos y/o curados elaborados en la Planta A. Se utilizó un modelo de fermentación de chorizo ibérico elaborado con diferentes cultivos protectores y se simularon diferentes condiciones de fermentación, una fermentación tradicional lenta a baja temperatura, y una fermentación rápida a alta temperatura.

Se empleó una masa de embutido preparada a partir de carne fresca picada de cerdo ibérico y el resto de ingredientes con los que se elabora el chorizo ibérico (tabla 3), que se dividió en tres lotes (apartado 5.10.2). A los lotes M2 y M3 se les añadieron los cultivos protectores *L. sakei* CTC494 y BactofermTM F-LC, respectivamente. El lote M1, sin cultivo protector, se empleó como control. Antes de su inoculación con *L. monocytogenes*, las masas de chorizo dieron resultado negativo en la detección de *Listeria* (< 20 CFU/g) en el medio CHROMagarTM *Listeria*. Las masas de chorizo se inocularon con un cóctel de *L. monocytogenes* preparado con cuatro cepas de diferente serotipo molecular (S2-1 [serotipo 1/2a], S4-2 [serotipo 1/2b], S12 [serotipo 1/2c] y S7-2 [serotipo 4b]) (tabla 6), a una concentración final de 10⁴ CFU/g (apartado 5.10.1).

Las masas inoculadas se incubaron durante 24 h a dos temperaturas diferentes, 7 °C (para permitir una acidificación lenta) y 20 °C (para provocar una acidificación más

rápida). Tras la incubación inicial, la temperatura se mantuvo en ambos casos a 7 °C hasta completar un total de 14 días.

6.2.1. Descenso del pH e inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*

El seguimiento de la fermentación en los diferentes lotes del embutido modelo se realizó mediante la medida del pH a lo largo de los 14 días del ensayo (apartado 5.10.3).

En el lote control M1, no se observó descenso del pH hasta el tercer día del ensayo con ninguna de las dos condiciones de temperatura (figuras 5a y 5b). En los lotes M2 y M3 fermentados a 20 °C, se observó descenso del pH desde el primer día del proceso (figura 5b). Ambos cultivos protectores mostraron, por tanto, la capacidad de producir ácido rápidamente a 20 °C. A 7 °C, la caída de pH comenzó a partir del tercer día y resultó idéntica en M2 y M3, con valores de pH inferiores a los del control M1 (figura 5a).

Los dos cultivos protectores mostraron diferente efecto sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* que se había inoculado a 4 unidades logarítmicas de las CFU/g, aproximadamente. La cepa *L. sakei* CTC494 (M2) ejerció un efecto bactericida bajo las dos condiciones de temperatura ensayadas, siendo capaz de reducir casi 2 unidades logarítmicas los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* al final del ensayo (reducciones de 1.7 unidades logarítmicas [$P < 0.01$] ó 1.9 unidades logarítmicas [$P < 0.05$] con las incubaciones iniciales de 7 °C y 20 °C, respectivamente; figuras 5c y 5d). El efecto bactericida se observó tras 7 y 2 días con las temperaturas iniciales de 7 °C y 20 °C, respectivamente. Bactoform™ F-LC (M3) no mostró efecto bactericida, pues los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* no se redujeron e incluso aumentaron ligeramente al final del ensayo (aumentos de 0.2 unidades logarítmicas [$P > 0.05$] y 1.0 unidades logarítmicas [$P < 0.001$] con las incubaciones iniciales de 7 °C y 20 °C, respectivamente; figuras 5c y 5d). Por tanto, en M3 solo se observó un efecto bacteriostático a 7 °C.

Comparados con el lote control (M1), ambos cultivos protectores redujeron significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes* (al menos en 2 unidades logarítmicas) tras los 14 días del ensayo. Bactoform™ F-LC (M3) impidió el crecimiento de *L. monocytogenes* tras 14 días de almacenamiento a 7 °C (reducción de 2.5 unidades logarítmicas, $P < 0.001$) (figura 5c). Con la temperatura inicial de 20 °C se logró una inhibición similar (reducción de 2.3 unidades logarítmicas de las CFU/g, $P < 0.0001$) (figura 5d) a pesar de que el patógeno creció durante los 3 primeros días.

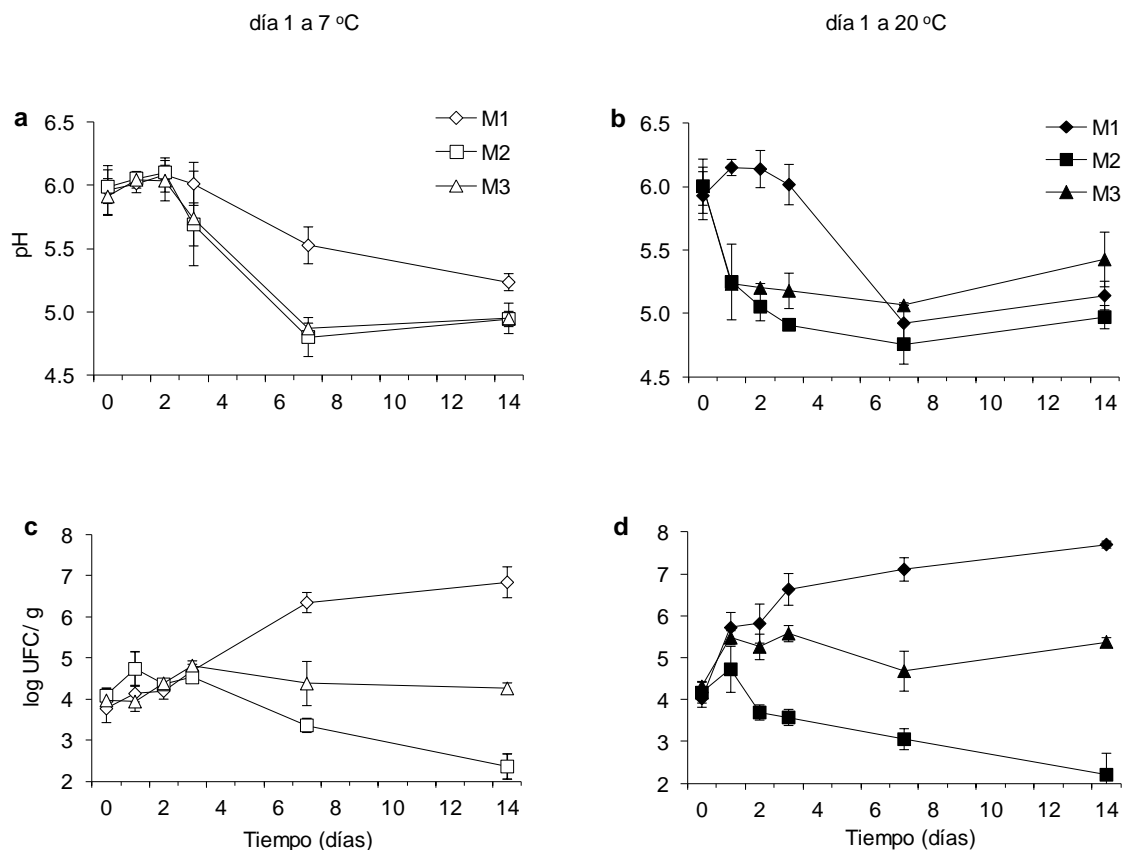


Figura 5. Evolución del pH y los recuentos de *L. monocytogenes* en el modelo de fermentación de chorizo ibérico. Los valores del pH (a, b) y los recuentos de *L. monocytogenes* (c, d) corresponden a las tres masas de carne (M1, masa control; M2, masa con *L. sakei* CTC494; M3, masa con BactofermTM F-LC) incubadas inicialmente a dos temperaturas diferentes (7 y 20 °C) seguida en ambos casos de una incubación a 7 °C durante 13 días. Las barras verticales representan el error estándar de la media ($n = 4$).

L. sakei CTC494 (M2) resultó mucho más efectivo en la reducción de *L. monocytogenes*, lo que se apreció desde el segundo día con la temperatura inicial de 20 °C, y dio lugar a reducciones muy significativas ($P < 0.0001$) con ambas temperaturas iniciales, 7 °C y 20 °C (reducciones de 4.4 y 5.4 unidades logarítmicas, respectivamente) (figuras 5c y 5d).

Los dos cultivos protectores redujeron el pH de forma idéntica a 7 °C mientras que a 20 °C la masa M2 registró valores menores a lo largo de todo el proceso (figuras 5a y 5b). La diferente inhibición de *L. monocytogenes* observada en M2 y M3 no pareció deberse, por tanto, al descenso del pH. Por otro lado, la inhibición de *L. monocytogenes* en M2 y M3 tuvo lugar a valores de pH que no son inhibitorios para la especie, de acuerdo con diversos estudios en los que se ha observado que *L. monocytogenes* crece a pH 4.1 en los medios de cultivo (Phan-Thanh 1998), y sobrevive a pH 4.9 en embutidos fermentados (Schillinger *et al.* 1991, Foegeding *et al.* 1992, Benkerroum *et al.* 2003, 2005). La actividad antilisteria de ambos cultivos bioprotectores pudo deberse, probablemente, a su capacidad de producción de bacteriocinas (Stiles y Hastings, 1991; Leroy *et al.* 2006).

Dado que la fermentación de los embutidos ibéricos tradicionales se realiza habitualmente a bajas temperaturas (≤ 10 °C), este trabajo se planteó para investigar si el efecto antilisteria de los dos cultivos protectores tenía lugar a 7 °C. Los resultados presentados en la figura 5c muestran que ni los componentes del chorizo ibérico tradicional ni la baja temperatura de fermentación impidieron la actividad antilisteria de ambos cultivos, pero la actividad fue bacteriostática en el caso de BactofermTM F-LC, y bactericida en el caso de *L. sakei* CTC494.

Los mejores resultados y la inhibición más rápida del patógeno se obtuvieron con *L. sakei* CTC494 (M2) y una temperatura inicial de 20 °C. Bajo esas condiciones se observó, por un lado, la mayor reducción en los recuentos de *L. monocytogenes*, que mostró colonias de menor tamaño en el medio CHROMagarTM *Listeria*, y por otro lado un efecto antilisteria más rápido, ya que la población de *L. monocytogenes* empezó a disminuir el segundo día del ensayo (figura 5d). Las propiedades fermentativas de *L. sakei* CTC494, aislado originalmente de un embutido español (Hugas *et al.* 1995), han sido muy estudiadas (Hugas *et al.* 2002, Leroy *et al.* 2006). *L. sakei* CTC494 produce sakacina K en un amplio intervalo de temperaturas (entre 4 °C y 30 °C) (Hugas *et al.* 1998), aunque su máximo crecimiento y producción de sakacina K se logran a temperaturas entre 20 y 25 °C y en un estrecho rango de pH (en torno al valor óptimo de 5.0) (Leroy y De Vuyst 1999). Ese valor corresponde al pH registrado el segundo día del ensayo en el lote M2/20 °C (figura 5b). No obstante, según los resultados de inhibición obtenidos en este estudio, *L. sakei* CTC494 produciría sakacina K a baja temperatura, tal y como se había publicado anteriormente (Hugas *et al.* 1998).

6.2.2. Reducción de la viabilidad de las cepas de *L. monocytogenes*

Con objeto de evaluar si determinadas cepas de *L. monocytogenes* presentaban alguna diferencia en su viabilidad en las condiciones que provocaron la mayor inhibición de *L. monocytogenes* (*L. sakei* CTC494 con una temperatura inicial de incubación de 20 °C), se comparó la evolución de los cuatro serotipos moleculares a lo largo del periodo de incubación.

La identificación del serotipo molecular mediante PCR (Doumith *et al.* 2004) se ha empleado en multitud de trabajos para la caracterización de cepas con fines epidemiológicos o para detectar la presencia de serotipos específicos a lo largo de la cadena alimentaria (López *et al.* 2007). Para comparar la viabilidad de las cuatro cepas inoculadas a lo largo del periodo de incubación, se analizaron 160 colonias procedentes de las placas de los recuentos realizados en CHROMagar™ *Listeria* mediante la PCR de serotipos. De ellas, 40 procedían de los recuentos del inóculo realizados antes de su empleo, y 40 de una de las réplicas de la masa M2/20 °C inmediatamente después de su inoculación (día 0), y a los 7 y 14 días de incubación. A lo largo del ensayo, los cuatro serotipos se detectaron en una proporción semejante a la del inóculo inicial (tabla 7).

Tabla 7. Evolución de los cuatro serotipos de *L. monocytogenes* en el modelo de fermentación de chorizo ibérico

Serotipo	Nº aislados ^a			
	Inóculo	M2/20 °C		
		Día 0	Día 7	Día 14
1/2a	2	5	6	3
1/2b	6	7	2	5
1/2c	9	1	8	1
4b	23	27	24	31

^a Número de aislados pertenecientes a cada serotipo molecular detectados en el inóculo y en la masa M2 sometida a una incubación inicial de 20 °C

Los diferentes serotipos de *L. monocytogenes* poseen diferencias en su capacidad de respuesta al estrés (Orsi *et al.* 2011) y, en particular, en su supervivencia tras la exposición a bacteriocinas (Ennahar *et al.* 2000, Buncic *et al.* 2001). Los resultados sobre la viabilidad de *L. monocytogenes* en los alimentos obtenidos con una sola cepa

no pueden, por tanto, extrapolarse a otras cepas de diferente serotipo (Lianou *et al.* 2006). Por otro lado, las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de los embutidos y de los ambientes en los que se elaboran parecen sobrevivir mejor en los embutidos fermentados que las cepas procedentes de otras fuentes (Thevenot *et al.* 2005a), por lo que resulta especialmente importante la selección de cepas adaptadas a ese ambiente particular. En este trabajo, la presencia de los cuatro serotipos moleculares al final del ensayo indica una supervivencia similar de estas cuatro cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de productos de cerdo ibérico, incluidos embutidos curados, lo que sugiere que dichas cepas se adaptaron inmediatamente a las condiciones de fermentación y, como consecuencia, pudieron ser fácilmente detectadas a través de los recuentos en placa.

Las características inherentes al procesado de los productos cárnicos curados (fundamentalmente el descenso de pH y actividad de agua) contribuyen a la reducción gradual de las poblaciones bacterianas patógenas durante la maduración y el almacenamiento, y, por ello, los niveles de *L. monocytogenes* presentes en los embutidos curados son habitualmente bajos (Encinas *et al.* 1999, Farber *et al.* 2007, Simpson *et al.* 2008). De hecho, a lo largo de los tres años iniciales de este trabajo, en los que se realizaron la mayoría de los muestreos del ambiente y productos cárnicos, tan solo se detectaron dos muestras con un nivel de contaminación superior a 100 CFU/g entre las 323 muestras de productos que resultaron positivas para *L. monocytogenes*. Los resultados de este ensayo sugieren que el empleo de *L. sakei* CTC494 como cultivo iniciador podría asegurar que la población de *L. monocytogenes* durante la maduración estaría por debajo de 100 CFU/g a lo largo de su vida útil, conforme a los niveles establecidos por la UE para productos RTE como los embutidos curados (European Commission 2005).

En conclusión, las condiciones de fermentación empleadas en este estudio permitieron la actividad anti-*Listeria* de los dos cultivos protectores en las masas de chorizo, pues ambos redujeron la viabilidad de cuatro subtipos de *L. monocytogenes* procedentes de productos de cerdo ibérico, tras 14 días de incubación. No obstante, los efectos variaron con las diferentes temperaturas iniciales. Mientras que BactofermTM F-LC ejerció un efecto bacteriostático a la temperatura inicial de 7 °C, *L. sakei* CTC494 mostró un efecto bactericida bajo las dos condiciones de temperatura inicial ensayadas (7 °C ó 20 °C), y fue capaz de reducir aproximadamente 2 unidades logarítmicas los recuentos iniciales

de *L. monocytogenes* en este modelo. *L. sakei* CTC494 podría, por tanto, resultar idóneo para el control de *L. monocytogenes* en el procesado a baja temperatura de los embutidos ibéricos curados, como cultivo iniciador y bioprotector.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PULSOTIPOS DE *L. MONOCYTOGENES* IDENTIFICADOS EN LA PLANTA A

El primer aislado obtenido de cada pulsotipo se seleccionó como la cepa tipo de dicho pulsotipo. La caracterización fenotípica y genotípica de los pulsotipos se realizó mediante el análisis de diferentes factores de virulencia, la movilidad, la capacidad de adhesión y la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos, de las 29 cepas tipo seleccionadas.

6.3.1. Factores de virulencia

6.3.1.1. Marcadores fenotípicos de la virulencia

La actividad de la hemolisina LLO y las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC de las 29 cepas se determinó cualitativamente comparando los halos formados en agar sangre, CHROMagarTM*Listeria* y CEYM, respectivamente (apartado 5.11.1).

El análisis de la actividad LLO permitió identificar tres fenotipos diferentes entre las 29 cepas (tabla 8). Las cepas S1 y S6 mostraron un fenotipo no hemolítico, similar al de *L. monocytogenes* ATCC 15313T (tabla 1). Las cepas S2-1 y S3 mostraron un fenotipo hiperhemolítico, similar al de la cepa control P14-A (tabla 1). Las 25 cepas restantes mostraron una actividad hemolítica similar a la de la cepa control EGD-e (tabla 1).

El análisis de la actividad PI-PLC en CHROMagarTM*Listeria* permitió identificar, igualmente, tres fenotipos entre las 29 cepas (tabla 8). Las cepas no hemolíticas S1 y S6 mostraron una actividad PI-PLC débil, similar a la de la cepa ATCC 15313T, y claramente inferior a la del resto de las cepas. Las cepas hiperhemolíticas S2-1 y S3 mostraron una actividad similar a la de la cepa P14-A. Las 25 cepas restantes mostraron una actividad similar a la de la cepa EGD-e.

En cuanto a la actividad lecitinasa, se identificaron dos fenotipos diferentes (tabla 8). Las cepas no hemolíticas S1 y S6 no mostraron actividad PC-PLC en el medio CEYM. El resto de cepas mostró una actividad similar a la de la cepa EGD-e.

Tabla 8. Características de las cepas tipo de los 29 pulsotipos identificados en la Planta A.

Cepa	LLO ^a	PI-PLC ^a	PC-PLC ^a	PMSC <i>inlA</i> ^b	Movilidad ^c	Adhesión ^c	Resistencia ^d	
							Cd	BAC
S1	-	↓	-	5	73.33 ± 3.51 ^{A,B}	24.00 ± 8.66 ^C	+	+
S2-1	↑	↑		6	72.67 ± 9.50 ^{A,B}	53.67 ± 9.24 ^{A,B,C}	+	
S3	↑	↑		6	69.67 ± 4.93 ^{A,B}	50.00 ± 10.82 ^{A,B,C}	+	
S4-1				0	72.00 ± 1.73 ^{A,B}	49.33 ± 9.07 ^{A,B,C}		
S4-2				0	74.00 ± 1.73 ^{A,B}	68.00 ± 9.85 ^{A,B,C}	+	
S4-3				0	72.67 ± 0.58 ^{A,B}	53.67 ± 11.02 ^{A,B,C}		
S5				12	77.67 ± 4.51 ^{A,B}	43.67 ± 3.06 ^{A,B,C}	+	
S6	-	↓	-	5	83.00 ± 1.73 ^A	25.67 ± 2.89 ^C	+	
S7-1				0	78.67 ± 11.50 ^{A,B}	61.30 ± 23.60 ^{A,B,C}		
S7-2				0	76.00 ± 3.61 ^{A,B}	64.30 ± 20.50 ^{A,B,C}		
S7-3				0	73.67 ± 7.57 ^{A,B}	54.70 ± 30.20 ^{A,B,C}		
S7-4				0	70.67 ± 9.07 ^{A,B}	51.00 ± 33.20 ^{A,B,C}		
S8				11	64.67 ± 6.51 ^{A,B}	84.00 ± 9.17 ^A	+	
S9				0	82.67 ± 15.37 ^A	67.00 ± 28.70 ^{A,B,C}		
S10-1				6	81.00 ± 12.00 ^A	79.70 ± 28.00 ^A	+	+
S10-2				6	50.33 ± 9.87 ^B	41.30 ± 21.20 ^{A,B,C}	+	
S11				0	65.67 ± 2.08 ^{A,B}	57.30 ± 21.50 ^{A,B,C}		
S12				12	66.67 ± 12.50 ^{A,B}	31.00 ± 3.46 ^{B,C}		
S13				0	81.33 ± 7.77 ^A	61.00 ± 14.11 ^{A,B,C}	+	
S14				0	76.67 ± 2.08 ^{A,B}	39.67 ± 4.16 ^{A,B,C}		
S15				0	78.00 ± 9.85 ^{A,B}	45.33 ± 3.79 ^{A,B,C}		
S16				5	74.00 ± 2.65 ^{A,B}	49.67 ± 8.33 ^{A,B,C}	+	
S17-1				0	79.67 ± 10.97 ^{A,B}	40.33 ± 7.02 ^{A,B,C}	+	
S17-2				0	62.67 ± 15.95 ^{A,B}	27.67 ± 11.93 ^C	+	
S18				0	81.33 ± 10.12 ^A	54.67 ± 3.79 ^{A,B,C}		
S19				0	78.67 ± 13.20 ^{A,B}	39.67 ± 4.16 ^{A,B,C}	+	
S20-1				0	83.30 ± 21.00 ^A	67.33 ± 8.50 ^{A,B,C}		
S20-2				0	71.00 ± 3.46 ^{A,B}	53.33 ± 10.12 ^{A,B,C}		
S21				12	87.67 ± 11.02 ^A	39.67 ± 9.45 ^{A,B,C}		

^a Actividad de la hemolisina LLO y de las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC. Todos los resultados fueron similares a los de la cepa control EGD-e, excepto los indicados como (-), que fueron totalmente negativos, y los indicados como (↓) ó (↑), que fueron inferiores y superiores, respectivamente, a los de la cepa EGD-e. ^b Tipo de mutación PMSC identificada en el gen *inlA*, según la numeración utilizada por Van Stelten *et al.* (2010); 0, secuencia *inlA* completa. ^c Porcentajes respecto a los valores de la cepa control Scott A (media de los resultados de tres ensayos independientes ± la desviación estándar). Los valores significativamente diferentes en cada columna ($P < 0.05$) se representan con letras mayúsculas diferentes. ^d +, MIC de cloruro de cadmio ≥ 40 mg/l; MIC de cloruro de benzalconio ≥ 10 mg/l.

La actividad hemolítica de las cepas se cuantificó en sobrenadantes de los cultivos bacterianos midiendo la hemoglobina liberada de eritrocitos de cordero (apartado 5.11.2). La titulación de la hemolisina confirmó los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo. Las cepas S1 y S6 (con valores de OD₅₄₃ de 0.11 y 0.17, respectivamente) mostraron una leve actividad hemolítica, considerablemente inferior (<10%) a la de la cepa control *L. monocytogenes* Scott A (OD₅₄₃ de 1.17). Las cepas S2-1 y S3 (con valores de OD₅₄₃ de 2.15 y 2.03, respectivamente) mostraron una actividad hemolítica mayor que el resto de las cepas (figura 6a).

Finalmente, se evaluó la capacidad de tres medios cromogénicos para detectar la actividad PI-PLC (CHROMagar™ *Listeria* y RAPID'L.mono) y PC-PLC (Brilliance™ *Listeria*) de las cepas de *L. monocytogenes* con diferentes fenotipos hemolíticos (apartado 5.11.1).

Las cepas S1 y S6 desarrollaron colonias con morfología y color similares al resto de cepas de *L. monocytogenes* en los medios CHROMagar™ *Listeria* y Brilliance™ *Listeria*, aunque con halos de diámetro muy inferior, detectables tan sólo a las 48 h de incubación. Las cepas S2-1 y S3, con halos de mayor diámetro en ambos medios, mostraron mayor actividad PI-PLC y PC-PLC que el resto de las cepas de *L. monocytogenes* (figura 6b).

En el medio RAPID'L.mono, la baja de actividad PI-PLC de las cepas S1 y S6 dio lugar a colonias de color blanco, a diferencia del color azul desarrollado por el resto de cepas, sin cambios apreciables tras 48 h de incubación. Por tanto, a diferencia de los medios CHROMagar™ *Listeria* y Brilliance™ *Listeria*, el medio RAPID'L.mono no permitió detectar diferencias entre las cepas con diferente fenotipo hemolítico.

La hemolisina LLO es una proteína fundamental para la patogenicidad de *L. monocytogenes*, y la falta de actividad hemolítica se ha relacionado con cepas débilmente virulentas o avirulentas (Cossart *et al.* 1989). Aunque, en principio, la falta de actividad hemolítica de las cepas S1 y S6 podría estar relacionada con una atenuación de la virulencia, la ausencia de actividad hemolítica y fosfolipasa no es suficiente para concluir que una cepa de *L. monocytogenes* es virulenta o no, pues tal y como han confirmado numerosos trabajos, esas proteínas pueden ser producidas tanto por cepas virulentas como por cepas avirulentas (Nørrung y Andersen 2000, Roche *et al.* 2005, Roche *et al.* 2009). Por otro lado, la expresión de los factores de virulencia regulados por PrfA, como LLO, PI-PLC y PC-PLC, es sensible a numerosos factores

ambientales, como la composición del medio de cultivo y la temperatura de crecimiento, por lo es posible que haya cepas que no sinteticen estas proteínas *in vitro* pero si *in vivo* (Coffey *et al.* 1996, Ermolaeva *et al.* 2003, Roberts *et al.* 2005).

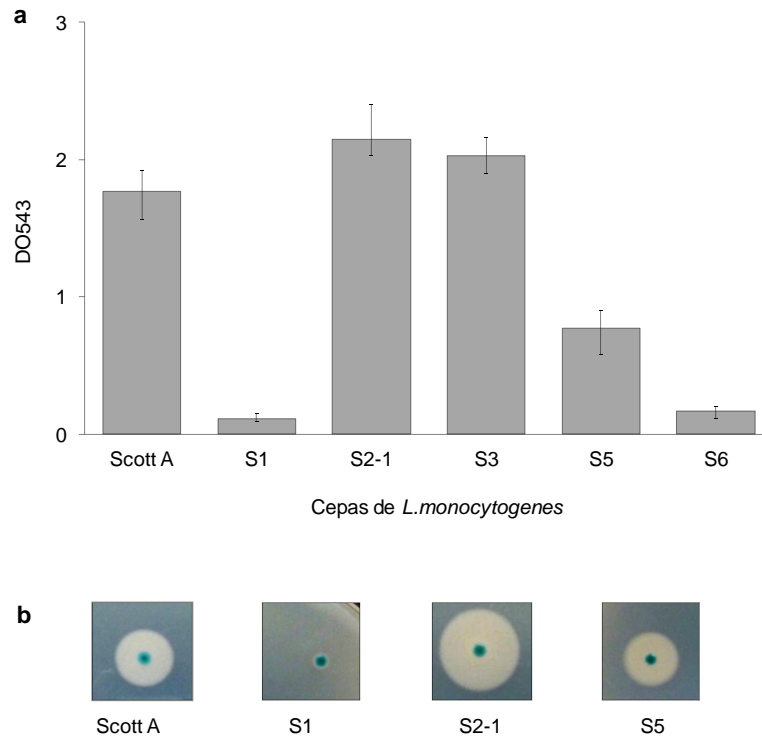


Figura 6. Comparación de fenotipos de virulencia de *L. monocytogenes*. Valores de actividad hemolítica en sobrenadantes de los cultivos de *L. monocytogenes* (a). Diferencias de morfología, color y halos de opacidad desarrollados por cepas representativas de *L. monocytogenes* en CHROMagarTM *Listeria* (b).

6.3.1.2. Mutaciones en los genes *prfA* e *inlA*

La presencia de mutaciones en el gen *prfA* se analizó en un fragmento de 469 pb (apartado 5.8.1), que incluye una región que contiene las dos mutaciones descritas previamente por Roche *et al.* (2012).

Las secuencias de *prfA* de las cepas S1 y S6 revelaron la presencia de una inserción de siete nucleótidos (CAGGAGT) en el codón 171, que provocaría un cambio en la fase de lectura y un codón de parada prematuro en la posición 178, y daría lugar a proteínas PrfA truncadas (PrfA Δ 174-237) (figura 7). La falta de activación de los principales

genes de virulencia de *L. monocytogenes* causada por una proteína PrfA truncada podría dar lugar a un fenotipo potencialmente avirulento (Roche *et al.* 2012).

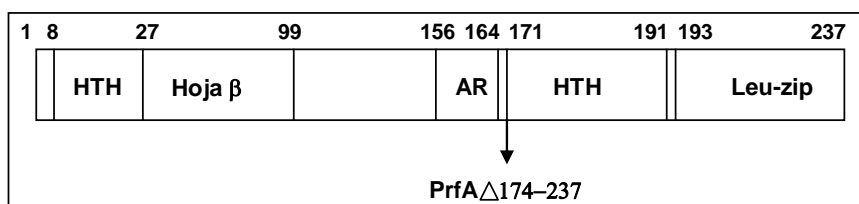


Figura 7. Localización de la mutación detectada en la secuencia del gen *prfA* de las cepas S1 y S6. Se muestran los dominios estructurales y las regiones funcionales conocidos en la proteína PrfA. AR: región de activación de la proteína; HTH: motivo hélice-giro-hélice; Leu-zip: cremallera de leucina.

Los resultados obtenidos podrían relacionar, por tanto, el fenotipo no hemolítico mostrado por las cepas S1 y S6 con una atenuación de la virulencia. Ambas cepas corresponden a dos pulsotipos de serotipo molecular 1/2a, estrechamente relacionados en el agrupamiento llevado a cabo tras el análisis de los perfiles de restricción (figura 3). Hasta el momento, esta mutación se ha identificado sólo en cepas de serotipo 1/2a. La existencia de cepas 1/2a avirulentas se podría relacionar con la escasa representación de este serotipo entre las cepas clínicas humanas (Orsi *et al.* 2011).

La presencia de esta mutación ha sido identificada previamente en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos, caracterizadas como avirulentas en modelos animales de infección. Se ha comprobado también que la transformación con el gen *prfA* de *L. monocytogenes* EGD-e restauraba la virulencia de estas cepas (Roche *et al.* 2005). Esta mutación ha sido descrita en diferentes países, por lo que podría ser habitual en determinados ambientes de procesamiento de alimentos (Roche *et al.* 2012, Lindbäck *et al.* 2011, López *et al.* 2013).

En el trabajo realizado por Lindbäck *et al.* (2011), se observó la reversibilidad entre el fenotipo no hemolítico y el fenotipo hemolítico en estos mutantes. En concreto, una cepa no hemolítica de un pulsotipo aislado persistentemente en una planta de procesamiento de pescado en Noruega, resultó avirulenta en ensayos con cultivos celulares e inyección subcutánea de 10^4 CFU en ratones. La misma cepa, tras la inyección intraperitoneal de

10⁹ CFU en ratones, mostró un fenotipo hemolítico y un 60% de letalidad. La secuenciación del gen *prfA* de la cepa no hemolítica, mostró la citada inserción de siete nucleótidos, mientras que la cepa aislada tras la infección (fenotipo hemolítico), presentó el gen *prfA* revertiente sin la inserción citada anteriormente. La reversión del gen *prfA* funcional probablemente podría explicar la recuperación de la virulencia potencial de la cepa inicialmente no hemolítica y avirulenta. El pulsotipo de esta cepa permitió relacionarla con cepas avirulentas aisladas en Francia por Roche *et al.* (2005), y con cepas de diversos orígenes aisladas en Noruega, algunas de ellas a partir de pacientes y, por tanto, patógenas (Lindbäck *et al.* 2011). Todas estas cepas podrían pertenecer a un subgrupo de *L. monocytogenes* con pulsotipos similares, en el que la reversibilidad de la virulencia observada tras la infección podría no ser un caso aislado.

El pulsotipo S1 resultó aparentemente muy similar al pulsotipo persistente de la planta de procesamiento noruega, donde aproximadamente el 50% de las muestras procedentes de los equipos y los productos resultó positivo para dicho pulsotipo no hemolítico. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos con el pulsotipo S1, identificado en un 45% de los aislados, y podrían indicar que pulsotipos similares de *L. monocytogenes* con su virulencia atenuada podrían predominar y persistir en plantas de procesamiento muy distantes (Jensen *et al.* 2008).

En el caso del gen *inlA*, se obtuvo la secuencia completa del gen (2400 pb) de las 29 cepas (apartado 5.8.1). El análisis del gen *inlA* permitió identificar cuatro mutaciones descritas anteriormente (Van Stelten *et al.* 2010) (figura 8), que darían lugar a codones de parada prematuros (PMSCs) en el gen y a la consiguiente expresión de proteínas InlA truncadas. Las cuatro cepas de serotipo molecular 1/2c (S5, S8, S12 y S21) y siete cepas de serotipo molecular 1/2a (S1, S2-1, S3, S6, S10-1, S10-2, S16) presentaron PMSCs en sus secuencias, lo que representaba el 38% de las cepas (tabla 8).

La presencia de mutaciones en genes de virulencia que dan lugar a PMSCs y la consiguiente atenuación de la virulencia es frecuente entre las cepas de serotipo 1/2a y, en cambio, es rara entre cepas de serotipo 4b (Roche *et al.* 2012, Kovacevic *et al.* 2013). En este trabajo, la identificación de mutaciones en el gen *inlA* de siete cepas de serotipo molecular 1/2a (el 64% de las cepas de dicho serotipo), confirma la existencia de un subgrupo de cepas de serotipo 1/2a, de origen alimentario principalmente, cuya virulencia estaría atenuada (Jacquet *et al.* 2004, Roche *et al.* 2012, Kovacevic *et al.* 2013, López *et al.* 2013).

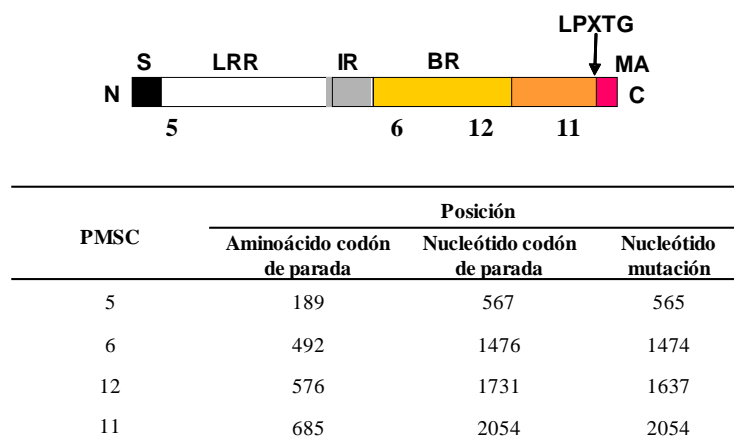


Figura 8. Representación de la secuencia de la proteína InlA. Se indica la posición de los PMSCs (Van Stelten *et al.* 2010) encontrados en las cepas de *L. monocytogenes* de este estudio. La tabla adjunta describe los PMSCs, indicando la posición de la mutación y del codón de parada. N, amino terminal; S, secuencia señal; LRR, repeticiones ricas en leucina; IR, región intergénica; BR, repeticiones B; LPXTG, secuencia consenso de la región de anclaje a la pared celular; MA, región de anclaje a la membrana; C, carboxilo terminal.

La marcada diversidad genética de las cepas de serotipo 1/2a y su frecuente presencia en alimentos, podrían facilitar la selección de mutaciones asociadas a la pérdida de la virulencia que favorecieran, no obstante, su supervivencia en el ambiente de la producción de alimentos (Orsi *et al.* 2011). En este trabajo, cuatro de las 11 cepas con PMSCs en sus secuencias *inlA* (S1, S2-1, S5 y S10-1) representaban a cuatro de los ocho pulsotipos persistentes identificados en la Planta A (tabla 6).

6.3.2. Susceptibilidad a antimicrobianos

6.3.2.1. Susceptibilidad a cloruro de benzalconio y cloruro de cadmio

La susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *L. monocytogenes* a cloruro de benzalconio (BAC) y a cloruro de cadmio (Cd) se determinó mediante un ensayo de dilución en agar Mueller Hinton (apartado 5.13.1.2).

Las cepas S1 (MIC de BAC = 10 mg/l) y S10-1 (MIC de BAC = 20 mg/l), fueron las únicas que se consideraron resistentes a BAC (BAC^R). Las veintisiete cepas restantes

(MICs de BAC = 1.25-2.5 mg/l), se consideraron sensibles a dicho desinfectante (BAC^S) (tabla 8). Catorce de las 29 cepas se consideraron resistentes a Cd (MIC \geq 40 mg/l), y las 15 restantes se consideraron sensibles a dicho metal pesado (MIC \leq 5 mg/l) (tabla 8).

6.3.2.2. Susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad de las 29 cepas de *L. monocytogenes* a un grupo de antibióticos que se emplean en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas, se analizó mediante el Etest® (apartado 5.13.1.1). Todas las cepas resultaron susceptibles a los 12 antibióticos incluidos en el antibiograma. La técnica resultó reproducible, pues las dos réplicas de las cepas de *L. monocytogenes* y las 10 réplicas de las cepas empleadas como controles de calidad, mostraron resultados dentro de los límites aceptables según los criterios del CLSI (2012) y EUCAST (2013) (tabla 9).

Tabla 9. Susceptibilidad *in vitro* de 29 cepas de *L. monocytogenes* a 12 antibióticos.

Antibiótico	Puntos de corte de resistencia (mg/l)	Rango MIC (mg/l) (n = 29, dos réplicas)
Ampicilina	>1.0 ^b	0.125–0.5
Cloranfenicol	>8.0 ^c	3.0–8.0
Cotrimoxazol ^a	>0.03 ^b	0.008–0.023
Eritromicina	>1.0 ^b	0.125–0.38
Gentamicina	>1.0 ^c	0.19–1.0
Imipenem	>0.25 ^d	0.064–0.19
Levofloxacino	>2.0 ^c	0.38–1.0
Linezolid	>4.0 ^c	1.5–3.0
Penicilina G	>1.0 ^b	0.094–0.5
Rifampicina	>0.5 ^c	0.004–0.125
Tetraciclina	>2.0 ^c	0.38–1.0
Vancomicina	>2.0 ^c	0.75–2.0

^a Combinación de trimetoprim con sulfametoxazol en proporción 1:19. Punto de corte expresado como la concentración de trimetoprim. ^b Puntos de corte propuestos para *L. monocytogenes* (EUCAST 2013). ^c Puntos de corte de *Staphylococcus* spp. (EUCAST 2013). ^d Punto de corte de *L. monocytogenes* para meropenem (EUCAST 2013).

Se ha publicado que los valores de las MICs determinados mediante el Etest® presentan una buena correlación con los obtenidos mediante los métodos estandarizados de análisis de susceptibilidad a antibióticos (CLSI 2012, EUCAST 2013) para la mayoría de las bacterias, incluida *Listeria* (<http://www.biomerieux-diagnostic.com>). Por ello, los puntos de corte correspondientes a las MICs obtenidas con los métodos estandarizados pueden emplearse para definir a un aislado como sensible o resistente mediante el Etest®. En este estudio, los resultados se interpretaron según los puntos de corte recomendados por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2013). Este comité propuso en el caso de *L. monocytogenes* puntos de corte para ampicilina, cotrimoxazol, eritromicina, meropenem y penicilina G, basados en los puntos de corte epidemiológicos. Teniendo en cuenta dichos puntos de corte, y los valores definidos para *Staphylococcus* spp. en aquellos antibióticos para los que no existe criterio de interpretación para *L. monocytogenes*, se llegó a la conclusión de que todas las cepas de *L. monocytogenes* analizadas eran susceptibles a los 12 antibióticos empleados (tabla 9).

La resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino son las más prevalentes en *L. monocytogenes* (Morvan *et al.* 2010, Lungu *et al.* 2011). En el presente trabajo cabe destacar, por tanto, la ausencia de resistencia a tetraciclina. En este trabajo no se utilizó ciprofloxacino, a pesar de su importancia en los estudios de desarrollo de resistencia *in vitro* y en los estudios epidemiológicos de la resistencia a antibióticos (Morvan *et al.* 2010, Granier *et al.* 2011, Lungu *et al.* 2011). La elección del levofloxacino como representante de las fluoroquinolonas en este estudio, se debió a su mayor relevancia clínica para el tratamiento de la listeriosis humana (MENSURA 2000), ya que presenta un efecto bactericida más rápido frente a bacterias intracelulares, y los aislados clínicos de *L. monocytogenes* resistentes a ciprofloxacino no presentan resistencia al levofloxacino (Godreuil *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos muestran la sensibilidad natural uniforme a los antibióticos que aún puede observarse en determinadas poblaciones de *L. monocytogenes*, específicas de determinados ambientes del procesado de alimentos. Según las conclusiones del estudio de la similitud genética, los 29 pulsotipos estaban clonalmente relacionados, y, por tanto, la uniformidad observada en los antibiogramas podría estar relacionada con el origen común de este grupo de cepas y su estrecha relación (figura 3). Por otro lado, estos resultados confirman que *L. monocytogenes* sigue siendo

mayoritariamente susceptible a los principales antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones humanas (Morvan *et al.* 2010, Granier *et al.* 2011, Lecuit y Leclercq 2012, Madeo *et al.* 2014), si bien, ante la evidencia de que la especie está desarrollando lentamente resistencia a algunos antimicrobianos (Morvan *et al.* 2010, Granier *et al.* 2011, Lungu *et al.* 2011), es necesaria una vigilancia constante de su susceptibilidad, con el fin de garantizar la eficacia de los tratamientos de la listeriosis humana.

6.3.3. Movilidad y capacidad de adhesión

La movilidad de las 29 cepas *L. monocytogenes* se analizó en BHI semisólido (apartado 5.12.1). Las 29 cepas mostraron un estrecho rango de movilidad, con valores comprendidos entre el 50% y el 87% del valor de la cepa control Scott A (tabla 8). Los análisis de comparación múltiple mediante la Prueba de Tukey mostraron diferencias significativas entre algunas de las cepas. La cepa S10-2 mostró la movilidad más reducida, con un valor del 50% respecto a la cepa Scott A, y siete cepas (S6, S9, S10-1, S13, S18, S20-1 y S21) mostraron niveles significativamente mayores que S10-2 (tabla 8).

La capacidad de adhesión (formación de *biofilm* de 48 h) de las cepas se determinó mediante un ensayo de tinción del *biofilm* con cristal violeta en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, con medio *TSYEB* (apartado 5.12.2). Las 29 cepas fueron capaces de adherirse al poliestireno, con valores de adhesión que variaron entre el 24% y el 84% del valor de la cepa control Scott A (tabla 8). Entre algunas de ellas se apreciaron diferencias significativas; por ejemplo, S1, S6 y S17-2 mostraron una capacidad de adhesión significativamente menor que las cepas S10-1 y S8 (tabla 8).

Los bajos valores de adhesión de los mutantes *prfA* S1 y S6 coinciden con los resultados obtenidos por Lemon *et al.* (2010) que concluyen que PrfA regula positivamente la formación de *biofilm*. Sin embargo, los resultados del presente estudio no coinciden con sus conclusiones, según las cuales “el requerimiento de PrfA para la formación de *biofilm* podría dar lugar a una presión selectiva para mantener este regulador de la virulencia cuando *L. monocytogenes* se encuentra en el ambiente, fuera del hospedador”. En nuestro estudio el mutante *prfA* S1 fue el pulsotipo más abundante en esta planta de procesado, identificado en el 45% de los aislados, a lo largo de los tres años del estudio (tabla 6). Estos datos, sin embargo, coinciden con pruebas más recientes de que la virulencia de *L. monocytogenes* regulada por PrfA supone un coste

biológico importante para la bacteria cuando se encuentra en el ambiente (Vasanthakrishnan *et al.* 2015).

La movilidad de *L. monocytogenes* es un fenotipo que contribuye a la capacidad de adhesión y formación de *biofilm* sobre diferentes tipos de superficies (Renier *et al.* 2011). En este grupo de cepas, no se apreció correlación positiva entre la movilidad y la capacidad de adhesión (coeficiente de Pearson, $r = 0.12$; $P > 0.05$), y ninguna de estas variables resultó asociada con el serotipo molecular, el linaje, ni la resistencia a BAC o a Cd ($P > 0.05$). La movilidad no mostró correlación con las mutaciones asociadas a la virulencia potencial, pero si hubo una asociación estadísticamente significativa entre la capacidad de adhesión y determinadas mutaciones asociadas a la atenuación de la virulencia. Los dos mutantes *prfA* (S1 y S6) mostraron menores niveles de adhesión, mientras que la cepa S8, con la mutación tipo 11 en *inlA*, mostró un nivel de adhesión significativamente mayor que las cepas con la mutación tipo 5 (S1, S6 y S16) o tipo 12 (S5, S12 y S21) (tabla 8).

6.4. RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LOS PULSOTIPOS DE *L. MONOCYTOGENES* Y SU “SUPERVIVENCIA” A LA DESINFECCIÓN EN LA PLANTA A

El número de pulsotipos detectados en la Planta A al pasar del primer al segundo año del estudio se incrementó de 12 a 25, incluyendo un número elevado de pulsotipos esporádicos. Tras el segundo año, con la aplicación de diversas estrategias de control de *L. monocytogenes* (apartado 6.1.1), el número de pulsotipos se redujo a 10 y descendió el número de aislados de la mayoría de los pulsotipos (tabla 6).

Finalizados los tres años del estudio, y como resultado de los muestreos realizados en la misma planta durante el año siguiente, se identificaron 24 aislados adicionales de *L. monocytogenes*, que se caracterizaron mediante PCR multiplex y PFGE (apartado 5.9). El descenso en el aislamiento de *L. monocytogenes* durante ese cuarto año vino acompañado de la identificación de cuatro pulsotipos (S1, S4-1, S6 y S10-1), detectados previamente en la Planta A (tablas 6 y 10), donde tres de ellos (S1, S4-1 y S10-1) habían resultado persistentes, y dos de ellos (S1 y S4-1) se habían considerado predominantes (apartado 6.1.4). Estos cuatro pulsotipos se consideraron “supervivientes”.

Tabla 10. Pulsotipos de *Listeria monocytogenes* “supervivientes”.

Pulsotipo	Nº de aislados
S1	13
S4-1	2
S6	1
S10-1	8

6.4.1. Características asociadas a la “supervivencia”

Mediante la Prueba exacta de Fisher se analizó la asociación de las características previamente estudiadas (tabla 8) con la “supervivencia” de los pulsotipos S1, S4-1, S6 y S10-1.

La Prueba exacta de Fisher no permitió asociar la “supervivencia” de un pulsotipo con algunas de las características analizadas (serotipo molecular, linaje o resistencia al cadmio). Tres de los pulsotipos (S1, S6 y S10-1) se habían caracterizado por la presencia de mutaciones asociadas a la atenuación de la virulencia, sin embargo, tampoco se pudo asociar la “supervivencia” de estos pulsotipos con la mayoría de las mutaciones identificadas en el gen *inlA* ($P > 0.05$), a excepción de la mutación tipo 5 ($P = 0.04$) (tabla 8). Respecto a *prfA*, S1 y S6 representaron una proporción significativa de los pulsotipos “supervivientes” (tabla 10, 50%; $P = 0.01$, Prueba exacta de Fisher).

Con el fin de determinar si la “supervivencia” estaba relacionada con la resistencia a los desinfectantes del grupo de los amonios cuaternarios, se analizó la susceptibilidad a BAC de los 24 aislados detectados durante el cuarto año (apartado 5.13.1.2). Todos los aislados de los pulsotipos S1, S6 y S10-1 resultaron BAC^R (MIC = 10-20 mg/l), pese a que el único aislado de pulsotipo S6 detectado previamente (el primer año del estudio) había resultado BAC^S (tabla 8). El pulsotipo S6, por tanto, incluía un aislado BAC^R y un aislado BAC^S. Todos los aislados estudiados de los pulsotipos S1 y S10-1, y el aislado del pulsotipo S6 detectado el cuarto año, por tanto, fueron las únicas cepas BAC^R identificadas durante los cuatro años en la Planta A.

La resistencia a BAC fue una de las tres variables asociadas a la “supervivencia” de los pulsotipos (75%; $P = 0.001$, Prueba exacta de Fisher), junto con la mutación en *prfA* y la mutación tipo 5 en *inlA* previamente identificadas (apartado 6.3.1.2). Los tres

pulsotipos “supervivientes” BAC^R (S1, S6 y S10-1) pertenecían al serotipo molecular 1/2a, mientras que el otro pulsotipo “superviviente” BAC^S (S4-1) pertenecía al serotipo molecular 1/2b.

Los desinfectantes de amonio cuaternario se emplearon en la Planta A con mayor frecuencia después del segundo año (comunicación personal de la empresa). Por tanto, la selección de cepas BAC^R de *L. monocytogenes* de serotipo molecular 1/2a, podría estar relacionada con ese aumento en el empleo de los desinfectantes de amonio cuaternario. Este supuesto parecía especialmente probable en el caso del pulsotipo S10-1, cuya resistencia podría justificar el aumento de su número de aislados al pasar del segundo al tercer año, fechas en las que el número de aislados de la mayoría de los pulsotipos se redujo (tabla 6). Como conclusión, se puede decir que los valores de las MICs de BAC de S1 y S10-1 podrían estar relacionados con la supervivencia prolongada de estos dos pulsotipos.

6.4.2. Genotipos de resistencia a cloruro de benzalconio

La presencia en las cepas BAC^R de dos marcadores genéticos conocidos que confieren resistencia a BAC en *L. monocytogenes*, el transposón Tn6188 (Müller *et al.* 2013) y el determinante genético de resistencia *bcrABC* (Elhanafi *et al.* 2010), se analizó mediante PCR (apartado 5.14).

El determinante genético *bcrABC* no se detectó en ninguna de las cepas BAC^R, y el transposón Tn6188 se detectó sólo en una de ellas (S10-1). Para la detección del Tn6188 se emplearon cebadores específicos del gen de resistencia *qacH* y del gen *radC* en el que está insertado el transposón en las cepas descritas por Müller *et al.* (2013), lo que sugiere que en S10-1 el transposón Tn6188 estaría integrado también en el *locus radC*. Estos autores (Müller *et al.* 2013) identificaron el transposón Tn6188 en 10 cepas de *L. monocytogenes*, de un total de 91 cepas analizadas por PCR, mientras que el determinante genético *bcrABC* lo detectaron en cinco cepas del mismo grupo de 91 cepas. Las cepas que contenían el transposón Tn6188, aisladas de alimentos o del ambiente de la producción de alimentos, eran predominantemente de serotipo 1/2a, al igual que la cepa S10-1. Dutta *et al.* (2013), por el contrario, al analizar un grupo de 116 cepas resistentes de diversos serotipos y orígenes (clínico, ambiental o alimentario), detectaron la presencia del determinante genético *bcrABC* en la mayoría de los aislados de *L. monocytogenes*, lo que sugiere una amplia distribución de *bcrABC* en las cepas BAC^R, independientemente de su serotipo o su origen.

6.4.3. Fenotipos de resistencia y susceptibilidad

Mediante la determinación de las MICs de diferentes compuestos antibacterianos, se analizó el fenotipo de resistencia de S1, S6 y S10-1, y la influencia de un inhibidor de las bombas de expulsión de tóxicos, la reserpina, sobre las MICs de BAC (apartado 5.13.1.2).

Además del fenotipo de resistencia de las cepas BAC^R “naturales” aisladas en la Planta A, se analizó el fenotipo del mutante BAC^R obtenido en el laboratorio (“artificial”) S2^{BAC}, y se comparó con el fenotipo de susceptibilidad de su cepa parental S2-1. El mutante S2^{BAC} se obtuvo mediante la selección de colonias de la cepa S2-1 (tabla 6) en agar Mueller Hinton suplementado con BAC, a partir de la placa con la mayor concentración de BAC que dio lugar a colonias que mostraron un incremento estable de la MIC tras el subcultivo sin BAC.

En los ensayos se incluyeron como controles la cepa de referencia *L. monocytogenes* EGD-e (BAC^S), y las cepas BAC^R *L. monocytogenes* 4423 y *L. monocytogenes* CDL 69 (tabla 1).

En S1, en el aislado BAC^R de S6, y en el mutante S2^{BAC}, se observó una correspondencia entre la resistencia a BAC y la resistencia a bromuro de etidio (MIC de bromuro de etidio de 160 mg/l), así como una reducción del 50% en la MIC de BAC debida a la presencia de reserpina (tabla 11). Este fenotipo de resistencia múltiple (MDR) se confirmó con el incremento de las MICs de dos antibióticos no relacionados con el BAC (ciprofloxacino y gentamicina) y los detergentes catiónicos CTAB (un compuesto de amonio cuaternario, como el BAC) y clorhexidina. En la mayoría de los casos, las MICs de los aislados BAC^R fueron tan sólo el doble de las de los aislados BAC^S del mismo pulsotipo (tabla 11).

Por el contrario, en S10-1 no se observó correspondencia entre la resistencia a BAC y a bromuro de etidio (MIC de bromuro de etidio de 40 mg/l), ni reducción de la MIC de BAC en presencia de reserpina. En S10-1 las MICs de ciprofloxacino, gentamicina y clorhexidina resultaron similares a las de la cepa susceptible EGD-e, y la MIC de CTAB (20 mg/l) fue igual a la de BAC (tabla 11).

Tabla 11. Patrones de resistencia y susceptibilidad de los cuatro pulsotipos “supervivientes”.

Cepa	MIC (mg/l)						
	BAC	BAC con reserpina	CTAB	Clorhexidina	Bromuro de etidio	Ciprofloxacino	Gentamicina
S1 ^a	10	5	10	5	160	5.0	0.6
S4-1 ^b	2.5	1.25	5	2.5	20	1.25	0.3
S6	10	5	10	5	160	5.0	0.6
S10-1	20	20	20	2.5	40	1.25	0.3
EGD-e	1.25	0.6	5	2.5	20	1.25	0.3
4423	20	20	20	2.5	40	1.25	0.6
CDL 69	20	20	10	2.5	40	1.25	0.3

^a Con S2^{BAC} se obtuvieron idénticos resultados. ^b Con el aislado BAC^S del pulsotipo S6 y con S2-1 (la cepa parental del mutante espontáneo S2^{BAC}), se obtuvieron idénticos resultados.

El fenotipo de resistencia mostrado por S1, el aislado BAC^R del pulsotipo S6 y el mutante S2^{BAC}, así como los resultados negativos de detección de los determinantes *qacH* y *bcrABC*, apuntan a que las bombas de expulsión de tóxicos podrían ser responsables, al menos en parte, de su resistencia. Este fenotipo podría asemejarse al de otras cepas BAC^R descritas previamente, tanto mutantes resistentes obtenidos en el laboratorio o “artificiales” (Romanova *et al.* 2006) similares a S2^{BAC}, como cepas resistentes “naturales” (Soumet *et al.* 2005) como S1.

6.5. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE CLORURO DE BENZALCONIO SOBRE LA FORMACIÓN DE *BIOFILM*

La relación entre la supervivencia de los microorganismos en el ambiente y la formación de *biofilm* (Lundén *et al.* 2000, Borucki *et al.* 2003), permite suponer que la exposición de *L. monocytogenes* a concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio (BAC) puede influir de manera diferente en la capacidad de formación de *biofilm* de las cepas resistentes (BAC^R) y sensibles (BAC^S). Para evaluar esa hipótesis, se comparó la capacidad de formación de *biofilm* en presencia y ausencia de BAC de tres cepas BAC^R (MIC = 10-20 mg/l) (de los tres pulsotipos “supervivientes” previamente analizados [tabla 11]) y ocho cepas BAC^S (MIC = 1.25-2.5 mg/l) (tabla 8).

Estas 11 cepas representaban la totalidad de cepas de serotipo molecular 1/2a detectadas en la Planta A (tabla 6).

En los análisis se incluyó la cepa de referencia EGD-e, de serotipo 1/2a (tabla 1) y la cepa BAC^R “artificial” S2^{BAC} (apartado 6.4.3).

6.5.1. Formación de *biofilm* en ausencia de cloruro de benzalconio

La formación de *biofilm* se determinó a los siete días, mediante un ensayo de tinción del *biofilm* con cristal violeta en microplacas de 96 pocillos con medio sTSYEB (apartado 5.12.3).

Todas las cepas de *L. monocytogenes* formaron *biofilm* en ausencia de BAC, aunque se observaron diferencias entre ellas. De las 11 cepas de serotipo 1/2a procedentes de la Planta A, el mayor nivel de *biofilm* se detectó en las cepas S2-1 y S3 (0.68), y el menor en la cepa S10-1 (0.23) (tabla 12).

Las tres cepas BAC^R (S1, S6 y S10-1) formaron menos *biofilm* que las ocho cepas BAC^S. Por tanto, se observó una asociación entre formación reducida de *biofilm* y resistencia a BAC ($P = 0.011$). Dada la “supervivencia” prolongada de las tres cepas BAC^R, la formación reducida de *biofilm* se asoció también con la “supervivencia” prolongada en la planta ($P = 0.011$). Nilsson *et al.* (2011) observaron anteriormente que en las poblaciones de *L. monocytogenes* de origen alimentario la mayoría de los aislados persistentes formaban menos *biofilm* que las cepas esporádicas, lo que coincide con nuestros resultados.

El valor del *biofilm* de la cepa EGD-e (0.28) podría considerarse intermedio entre los valores de las cepas BAC^R (0.23- 0.25) y las BAC^S (0.34- 0.68).

El valor del *biofilm* del mutante de laboratorio S2^{BAC} (0.74) fue similar al de su cepa parental S2-1, y superior al de las cepas BAC^R “naturales” (tabla 12). El valor de la MIC de BAC de la cepa S2^{BAC} (20 mg/l) fue ocho veces superior al de su cepa parental S2-1, y similar a la de la cepa BAC^R “natural” S10-1 (tabla 12). En la cepa BAC^R obtenida artificialmente S2^{BAC}, por tanto, la resistencia no se relacionó con un bajo nivel de *biofilm*, lo que indica que las cepas BAC^R “naturales” podrían poseer cambios/mutaciones adicionales respecto a los mutantes BAC^R seleccionados artificialmente.

Tabla 12. Características de las 13 cepas de *L. monocytogenes* de serotipo molecular 1/2a incluidas en los ensayos de formación de *biofilm*.

Cepa	MIC BAC (mg/l)	<i>Biofilm</i> ^{a, d}	OD ₆₀₀ ^{b, d}	[μ(OD ₆₀₀)] ^{c, d}
S1	10	0.25 ± 0.03 ^F	0.29 ± 0.06 ^{BC}	0.16 ± 0.01 ^A
S2-1	2.5	0.68 ± 0.06 ^A	0.31 ± 0.04 ^{BC}	0.15 ± 0.00 ^A
S3	2.5	0.68 ± 0.07 ^A	0.30 ± 0.03 ^{BC}	0.15 ± 0.00 ^A
S6	10	0.24 ± 0.05 ^F	0.28 ± 0.04 ^{BC}	0.16 ± 0.00 ^A
S10-1	20	0.23 ± 0.04 ^F	0.36 ± 0.06 ^A	0.13 ± 0.00 ^A
S10-2	2.5	0.41 ± 0.06 ^{CD}	0.28 ± 0.04 ^C	0.12 ± 0.01 ^A
S11	2.5	0.37 ± 0.07 ^{DE}	0.33 ± 0.06 ^{AB}	0.12 ± 0.00 ^A
S14	2.5	0.44 ± 0.07 ^C	0.28 ± 0.03 ^{BC}	0.14 ± 0.00 ^A
S15	2.5	0.34 ± 0.05 ^E	0.27 ± 0.03 ^C	0.14 ± 0.00 ^A
S16	2.5	0.45 ± 0.05 ^C	0.31 ± 0.03 ^{BC}	0.13 ± 0.02 ^A
S19	2.5	0.52 ± 0.08 ^B	0.31 ± 0.05 ^{BC}	0.15 ± 0.00 ^A
EGD-e	1.25	0.28 ± 0.05	0.37 ± 0.06	0.15 ± 0.00
S2 ^{BAC}	20	0.74 ± 0.11	0.26 ± 0.01	0.14 ± 0.01

^a *Biofilm* en ausencia de BAC. ^b Densidad celular a las 24 h. ^c Tasa máxima de crecimiento específico. ^d Los valores representan la media de 18 resultados (tres ensayos independientes con seis determinaciones en cada uno) ± la desviación estándar. Los valores significativamente diferentes en cada columna ($P < 0.05$, Prueba de Tukey) se representan con letras mayúsculas diferentes.

6.5.2. Crecimiento de *L. monocytogenes* en el medio de formación de *biofilm*

El crecimiento de *L. monocytogenes* en el medio sTSYEB sin BAC se midió, por un lado como la densidad celular (OD₆₀₀) a las 24 h y, por otro lado como la tasa máxima de crecimiento específico [μ(OD₆₀₀)] (apartado 5.12.4).

En el caso de la densidad celular, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre numerosas cepas. La cepa BAC^R S10-1, por ejemplo, mostró mayor densidad celular (0.36) que el resto de las cepas, incluidas las cepas BAC^R S1 y S6 (cuyas densidades celulares fueron 0.29 y 0.28, respectivamente) (tabla 12). Por tanto, la densidad celular no se asoció con el nivel de *biofilm*, y un *biofilm* escaso no se relacionó necesariamente con una baja densidad celular.

En el caso de la tasa máxima de crecimiento específico, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ninguna cepa (tabla 12). La semejanza de la tasa de

crecimiento de las cepas con diferente producción de *biofilm*, indica que el efecto de la resistencia a BAC en la reducida formación de *biofilm* fue independiente de la tasa de crecimiento de las células planctónicas. Estos resultados confirman que la tasa de crecimiento en las condiciones de crecimiento óptimas para *L. monocytogenes* no se relaciona directamente con la formación de *biofilm* (Djordjevic *et al.* 2002, Pan *et al.* 2010). No obstante, el crecimiento en condiciones de estrés podría afectar a la formación de *biofilm*.

6.5.3. Formación de *biofilm* en presencia de cloruro de benzalconio

La formación de *biofilm* en presencia de BAC se determinó en microplacas con medio sTSYEB suplementado con concentraciones del biocida de 0.07 a 40 mg/l (apartado 5.12.3).

De las 10 concentraciones de BAC ensayadas, sólo tres (1.25, 2.5 y 5 mg/l) afectaron de forma diferente a la formación de *biofilm* de este grupo de cepas de *L. monocytogenes* (tabla 13).

Tabla 13. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la formación de *biofilm* de 13 cepas de *L. monocytogenes* de serotipo 1/2a.

Cepa	Porcentaje relativo de <i>biofilm</i> ^a		
	1.25 mg/l	2.5 mg/l	5 mg/l
S1	84	42	0
S2-1	78	42	0
S3	71	32	0
S6	60	32	0
S10-1	97	105	62
S10-2	63	41	0
S11	59	70	0
S14	47	66	0
S15	56	83	0
S16	48	54	0
S19	39	55	0
EGD-e	35	31	0
S2^{BAC}	123	108	41

^a Los resultados representan la media de los porcentajes de *biofilm* formado en presencia de diferentes concentraciones de BAC (1.25, 2.5 y 5 mg/l) frente al control sin BAC (100%). En negrita, cepas escogidas como representantes de los cuatro patrones de variación del *biofilm* observados en función de la concentración de BAC.

A la concentración de 1.25 mg/l de BAC, todas las cepas a excepción de S10-1 y S2^{BAC}, formaron menos *biofilm* ($P < 0.05$) respecto a los controles sin BAC (figura 9, tabla 13). El comportamiento de las cepas BAC^R S1 y S6 fue similar al de las cepas BAC^S. La cepa S10-1 mantuvo un nivel de *biofilm* del 97%, mientras que la cepa S2^{BAC} incrementó significativamente el nivel de su *biofilm* hasta el 123% ($P < 0.05$) con respecto al control sin BAC. Por tanto, la resistencia de S2^{BAC} estimuló la formación de *biofilm* en presencia de 1.25 mg/l de BAC, una concentración que redujo significativamente el nivel de *biofilm* de su cepa parental S2-1 (tabla 13).

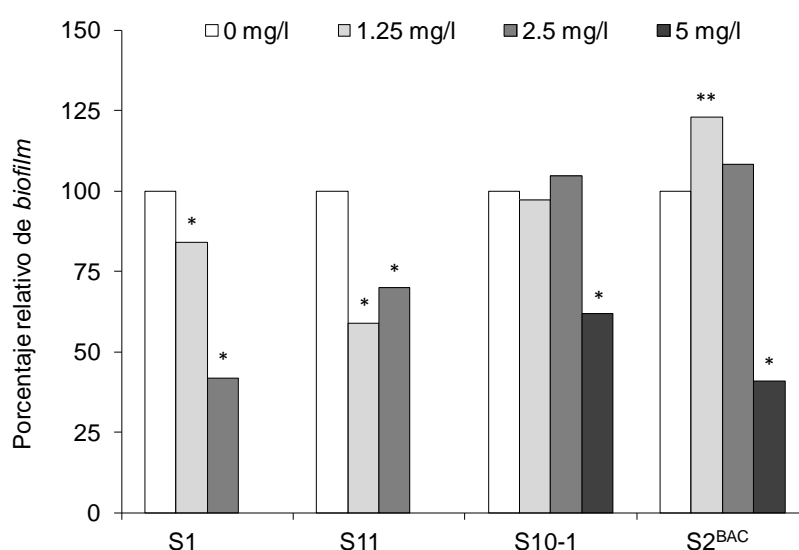


Figura 9. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la formación de *biofilm*. Se muestran las cepas representativas S1, S11, S10-1, y S2^{BAC}. Los resultados muestran la media de los porcentajes de formación de *biofilm* en presencia de 1.25, 2.5 y 5 mg/l de BAC respecto al control sin BAC (100%). Los asteriscos indican la reducción (*) o aumento (**) significativos ($P < 0.05$, Prueba *t* de Student).

A la concentración de 2.5 mg/l de BAC, que es el valor de la MIC de la mayoría de las cepas BAC^S (tabla 12), se observó una significativa reducción adicional del *biofilm* en la mayoría de las cepas ($P < 0.05$), excepto en S10-1 y S2^{BAC} (figura 9). A esta concentración, aumentó el nivel de *biofilm* de un grupo de cinco cepas (S11, S14, S15,

S16 y S19) con respecto a lo observado a la concentración de 1.25 mg/l, aunque este aumento no fue significativo ($P > 0.05$) (tabla 13).

En el conjunto de las 13 cepas se observaron cuatro patrones de variación del *biofilm* debido a esas concentraciones, que aparecen representados en la figura 9 por las cepas S1 (con valores similares a las cepas S2-1, S3, S6, S10-2 y EGD-e), S11 (con valores similares a S14, S15, S16 y S19), S10-1 y S2^{BAC}.

A la concentración de 5 mg/l de BAC, se observó una completa inhibición de la formación de *biofilm* en todas las cepas, excepto S10-1 y S2^{BAC} (figura 9). Estas dos cepas, por tanto, fueron capaces de formar *biofilm* a una concentración de BAC que inhibía totalmente la formación del *biofilm* en el resto de las cepas, aunque los niveles del *biofilm* de S10-1 y S2^{BAC} en presencia de 5 mg/l de BAC eran significativamente menores ($P < 0.05$) con respecto a los controles sin BAC (figura 9).

La adhesión inicial a las superficies, crucial en la formación del *biofilm* como primer paso en la construcción de la arquitectura del mismo, puede variar en un nicho específico en función de las propiedades del medio de crecimiento y de la composición de la superficie celular bacteriana. Dynes *et al.* (2009) han observado que, en presencia de concentraciones subinhibitorias de BAC, las células y los *biofilms* de *Pseudomonas fluorescens* pueden cambiar su morfología y arquitectura, así como la distribución y abundancia de macromoléculas, en particular de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS). También se ha observado una estimulación de la formación de *biofilm* en *Staphylococcus epidermidis* por concentraciones subinhibitorias de BAC (Houari y Di Martino 2007). En *L. monocytogenes*, la exposición a concentraciones subinhibitorias de BAC provoca, igualmente, cambios en la morfología celular (To *et al.* 2002) y en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos celulares (Bisbiroulas *et al.* 2011). Los QACs pueden inducir también complejas modificaciones del peptidoglicano en *L. monocytogenes* (Fox *et al.* 2011).

Según los resultados del presente estudio, dichos cambios pueden variar en función de la cepa de *L. monocytogenes*. El efecto de 1.25 mg/l de BAC sobre la formación de *biofilm* fue distinto en cepas con diferentes MICs, es decir, en cepas BAC^S y BAC^R, e incluso, entre cepas BAC^R con MICs similares, como S10-1 y S2^{BAC}. De forma similar a este efecto sobre la formación de *biofilm*, se ha observado recientemente que el efecto

de 1.25 mg/l de BAC sobre la virulencia de *L. monocytogenes* puede diferir entre cepas con diferente susceptibilidad a BAC (Pricope *et al.* 2013).

La formación de *biofilm* en presencia de concentraciones subinhibitorias crecientes de BAC se observó sólo en una cepa BAC^R “natural”, la cepa S10-1 (figura 9). En cepas BAC^R similares a S10-1, la presencia de concentraciones subinhibitorias de BAC en el ambiente podría proporcionarles una ventaja, al compensar la débil formación de *biofilm* asociada a la resistencia. Por ejemplo, el valor absoluto del *biofilm* formado por S10-1 a la concentración de 2.5 mg/l de BAC, fue similar al formado por la cepa BAC^S S2-1 (figura 10), y a la concentración de 5 mg/l de BAC la cepa S10-1 fue la única, junto con S2^{BAC}, capaz de formar *biofilm* (figura 9). La capacidad de formación de *biofilm* en presencia de concentraciones subinhibitorias de desinfectante podría estar relacionada con la supervivencia prolongada de la cepa S10-1 en la planta (apartado 6.4, tablas 6 y 10).

En el caso de S2^{BAC}, la resistencia no afectó a la formación de *biofilm* en ausencia de BAC en comparación con su cepa parental S2-1 (tabla 12). Además, el aumento del *biofilm* observado en S2^{BAC} a concentraciones (1.25 mg/l) que redujeron el *biofilm* de la mayoría de las cepas, incluida S2-1, avala la hipótesis de que las cepas resistentes pueden ser capaces de sobrevivir a los procesos de limpieza y desinfección. La resistencia al BAC se ha observado en diferentes bacterias (To *et al.* 2002, Dynes *et al.* 2009), y las bacterias resistentes pueden mostrar una mayor capacidad de adhesión y formación de *biofilm*, especialmente sobre superficies de poliestireno tratadas con BAC. El tratamiento con BAC puede alterar las condiciones fisicoquímicas tanto de las bacterias resistentes como de las superficies de poliestireno, alterando su hidrofobicidad y promoviendo la adhesión bacteriana (Machado *et al.* 2011).

6.5.4. Efecto del cloruro de benzalconio sobre la viabilidad de las células planctónicas

Para evaluar el efecto del BAC sobre la viabilidad de las células planctónicas, se comparó su actividad bactericida sobre las cepas BAC^R S1 y S10-1, y sobre la cepa BAC^S S2-1 (apartado 5.13.2). Los resultados de viabilidad se compararon con los valores absolutos del *biofilm* formado por las mismas cepas en las mismas concentraciones de BAC (figura 10).

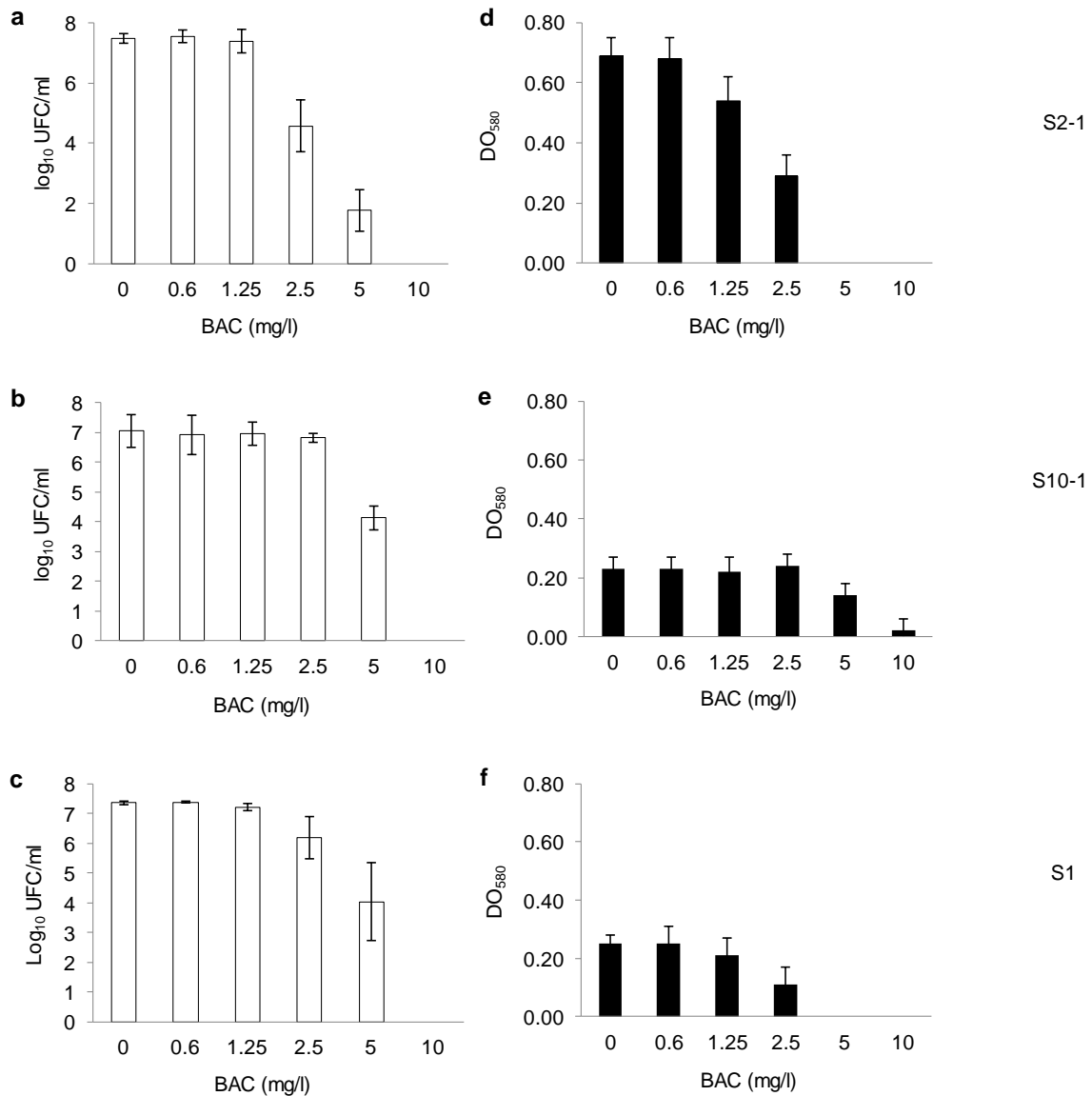


Figura 10. Reducción de la viabilidad y del biofilm en presencia de cloruro de benzalconio. Se ensayó la actividad bactericida del BAC (\log_{10} CFU/ml) en agua peptonada y valores del *biofilm* (OD_{580}) en medio sTSYEB con BAC, de las cepas S2-1 (a, d), S10-1 (b, e) y S1 (c, f). Los resultados corresponden a la media de tres ensayos independientes. Las barras muestran el error estándar de la media.

La incubación de S2-1 con 1.25 mg/l de BAC (concentración correspondiente al 50% de su MIC) dio lugar a una pequeña reducción de la viabilidad (menos de 1 log, figura 10a). La incubación de las cepas BAC^R S1 y S10-1, con 5 y 10 mg/l de BAC (correspondientes al 50% de sus respectivas MICs), dio lugar a importantes reducciones de la viabilidad (superiores a 3 y 5 log, respectivamente; figura 10b y 10c). Por tanto, el efecto bactericida del BAC subinhibitorio fue más marcado en las cepas BAC^R. Este efecto sobre la viabilidad de las células planctónicas resultó paralelo al efecto de las mismas concentraciones de BAC sobre la formación de *biofilm* (figura 10d, 10e y 10f). Aunque los amonios cuaternarios son compuestos marcadamente bactericidas (Tezel y Pavlostathis 2011) y con actividad anti-*biofilm* (Nilsson *et al.* 2011), nuestros resultados muestran que las cepas de *L. monocytogenes* con diferentes MICs responden de diferente manera al BAC subinhibitorio, tanto si se trata de células planctónicas como sésiles.

En un estudio de expresión génica en presencia de concentraciones subletales de BAC llevado a cabo con cepas de *L. monocytogenes* de origen clínico y alimentario, Tamburro *et al.* (2015) observaron reducción de la viabilidad en el 45% de las cepas. Curiosamente, los aislados de origen alimentario resultaron más sensibles que los clínicos.

6.6. PERSISTENCIA AMBIENTAL DE *L. MONOCYTOGENES* EN LA PLANTA B. RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA DESINFECCIÓN.

Durante un periodo de 27 meses se analizó la contaminación por *L. monocytogenes* en una planta de procesado de cerdo ibérico de nueva construcción (Planta B), dedicada fundamentalmente al envasado de productos curados RTE procedentes de la planta de sacrificio y procesado previamente estudiada (Planta A) (apartado 5.4.1). La finalidad del estudio fue investigar la persistencia de *L. monocytogenes* en la Planta B. Las superficies limpias y desinfectadas de la Planta B fueron analizadas con objeto de determinar si la persistencia estaba asociada a la resistencia a los desinfectantes, y si los subtipos persistentes de *L. monocytogenes* en la Planta B podían provenir de las materias primas procedentes de la planta A, localizada a 22 km de distancia.

Doce meses después de la puesta en funcionamiento de la Planta B, se aisló por primera vez *L. monocytogenes* a partir de una muestra ambiental tomada tras la limpieza y

desinfección, inmediatamente antes de iniciar la jornada de trabajo. El primer resultado positivo se obtuvo, por tanto, durante el mes número 13 del estudio. Durante los meses 15, 16, 17, 18, 20, 21 y 25, no se aisló *L. monocytogenes* a partir de ninguna muestra (tabla 14). En los meses con resultados positivos se identificaron 14 aislados de *L. monocytogenes* procedentes de diferentes superficies de contacto con los alimentos y del ambiente general.

Tabla 14. Incidencia de los pulsotipos de *L. monocytogenes* detectados en el ambiente de la Planta B.

Mes ^a	Pulsotipo	Nº de aislados
13,14, 23	S1	4
19	S10-1	1
22, 23, 24, 26, 27	S2-2	8
22	S2-3	1
26	S10-3	1 ^b

^a Los números del 1 al 27 representan meses consecutivos desde noviembre de 2008 (mes 1) hasta enero de 2011 (mes 27). En los meses que no figuran en la tabla no se detectó *L. monocytogenes*. ^b Obtenido durante la jornada de trabajo.

Este bajo nivel de contaminación detectado antes de iniciar la jornada de trabajo, puede reflejar la ecología de *L. monocytogenes* en el ambiente de las áreas de post-procesado de los alimentos, que suelen ser desinfectadas de forma agresiva (Ferreira *et al.* 2014, Malley *et al.* 2015). Al analizar el ambiente de esas áreas antes de iniciar la jornada de trabajo, cabe esperar una ausencia total de *L. monocytogenes*. Ocasionalmente, con un programa efectivo de muestreo es posible obtener muestras positivas que faciliten la adopción de las medidas correctoras adecuadas (Carpentier y Cerf 2011, Muhterem-Uyar *et al.* 2015). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que, tras 12 meses de actividad, la planta resultó colonizada por diferentes cepas de *L. monocytogenes* capaces de permanecer viables en el ambiente tras las tareas de limpieza y desinfección (tabla 14), y que podrían ser, por tanto, resistentes a los desinfectantes.

6.6.1. Subtipos de *L. monocytogenes* identificados en la Planta B

6.6.1.1. Serotipos moleculares y pulsotipos

Los 14 aislados de *L. monocytogenes* identificados en la Planta B se analizaron mediante la PCR multiplex de identificación del serotipo molecular, y mediante PFGE .

La primera vez que se identificó *L. monocytogenes* en la Planta B (mes número 13), se detectó el pulsotipo S1 que había sido identificado previamente en la Planta A. Seis meses después (mes número 19), se detectó el pulsotipo S10-1 identificado también en la Planta A (tablas 6 y 14). A partir del mes número 22, se identificaron dos pulsotipos nuevos (S2-2 y S2-3) (tabla 14). Aunque el estudio estaba dirigido a la detección de *L. monocytogenes* en las superficies limpias y desinfectadas, también se incluyó el pulsotipo S10-3 aislado exclusivamente durante la jornada de trabajo, por tratarse de un pulsotipo nuevo (tabla 14).

Los pulsotipos S1 y S2-2 se consideraron los únicos pulsotipos persistentes en la Planta B de acuerdo con el criterio de persistencia definido previamente en la Planta A. El pulsotipo S2-2 se detectó en dos ocasiones (en los meses 21 y 26) en sendas muestras de jamón curado. Este fue el único producto final que resultó contaminado con *L. monocytogenes* durante todo el periodo analizado, con un nivel de contaminación inferior a 100 CFU/g en ambas ocasiones.

La caracterización mediante PFGE de los aislados de *L. monocytogenes* de origen alimentario puede resultar muy útil para determinar si la contaminación ambiental de una cadena de procesamiento particular se debe a la persistencia ambiental o a la entrada de materias primas contaminadas (Carpentier y Cerf 2011, Ferreira *et al.* 2014). De los cinco pulsotipos detectados en la Planta B, S1 y S10-1 se habían detectado previamente en diferentes productos de la Planta A (tabla 6), indicando un probable origen de los subtipos de *L. monocytogenes* que finalmente colonizaron el ambiente de la Planta B (Thévenot *et al.* 2006a, Berrang *et al.* 2010).

En algunos casos, el estudio de los subtipos moleculares permite determinar también la transferencia de las bacterias desde el ambiente a los alimentos (Thévenot *et al.* 2006a). En dos ocasiones, el pulsotipo S2-2, que se había aislado repetidamente en el ambiente y por tanto parecía residir en la planta (tabla 14), se aisló en sendas muestras de jamón curado. Inmediatamente se tomaron las medidas correctoras dentro del plan de la empresa para manejar tal contingencia (incluida la retirada de los productos

sospechosos y un aumento de la frecuencia e intensidad de la desinfección de esa línea de procesamiento concreta). Tras los incidentes, se realizaron muestreos más exhaustivos de los productos finales y de las superficies en contacto con ellos, y no se detectó *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras.

Los cinco pulsotipos detectados en la Planta B pertenecieron al serotipo molecular 1/2a. Estos subtipos se compararon con los de la Planta A, donde 11 de los 29 pulsotipos identificados pertenecían al serotipo molecular 1/2a. El dendrograma generado mediante el método UPGMA con los perfiles *AscI-ApaI*, reflejó la similitud genética de esta población de 14 pulsotipos de *L. monocytogenes* de serotipo molecular 1/2a (figura 11). Los pulsotipos identificados en la Planta B, se separaron en dos *clusters*, el primero de ellos (*cluster* 1) contenía el pulsotipo S1, y el segundo (*cluster* 2) los pulsotipos S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3.

La identificación de serotipos mediante PCR mostró la probable predominancia del serotipo molecular 1/2a en el ambiente de procesamiento analizado, confirmando la mayor capacidad de supervivencia de los aislados de *L. monocytogenes* del linaje II (en el que se incluye el serotipo molecular 1/2a), en el ambiente del procesamiento de alimentos (Nightingale 2010, Orsi *et al.* 2011). La predominancia del serotipo 1/2a en los productos RTE crudos y cocinados es de gran importancia para la salud pública pues, tras los serotipos 4b y 1/2b, este serotipo se asocia con frecuencia con brotes y casos esporádicos de listeriosis humana (O'Connor *et al.* 2010, Orsi *et al.* 2011).

6.6.1.2. Subtipos *inlA*

La secuenciación del gen *inlA* completo de cinco aislados de los diferentes pulsotipos identificados en la Planta B mostró que S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3 compartían una secuencia *inlA* idéntica (subtipo *inlA* 2) y diferente de la de S1 (subtipo *inlA* 1). Igualmente, se identificaron dos tipos de mutaciones diferentes, descritas anteriormente (van Stelten *et al.* 2010) (figura 8), que darían lugar a PMSCs en el gen y a la consiguiente expresión de proteínas InlA truncadas: la mutación tipo 5 en el subtipo *inlA* 1 y la mutación tipo 6 en el subtipo *inlA* 2. La secuenciación de *inlA* confirmó, por tanto, la relación entre las cepas de la Planta B y su separación en dos *clusters*, tal como se había observado mediante el estudio de los pulsotipos (figura 11).

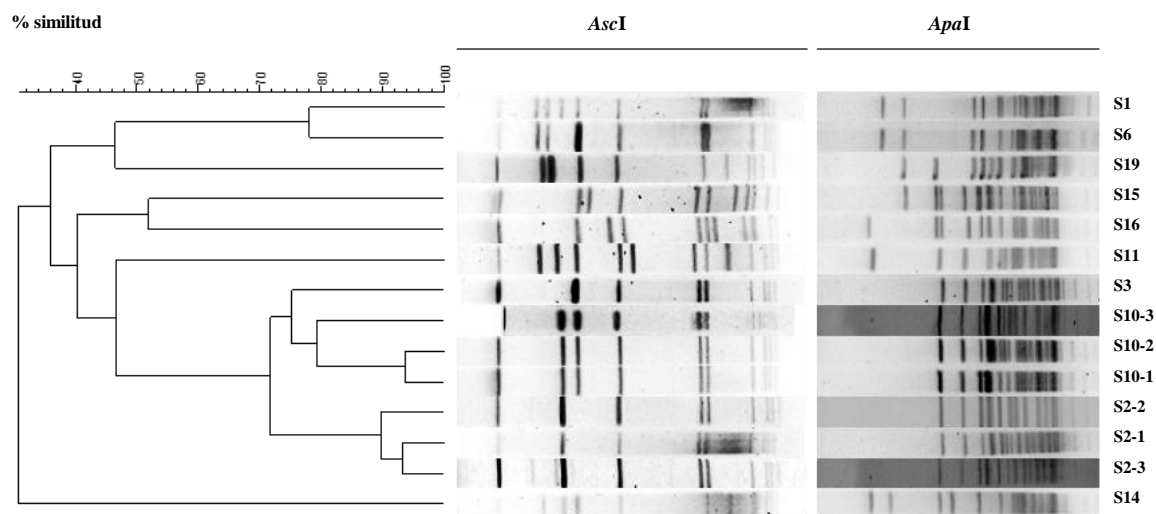


Figura 11. Dendrograma de los 14 pulsotipos de serotipo molecular 1/2a identificados en las Plantas A y B.

6.6.2. Susceptibilidad a antimicrobianos de los subtipos de la Planta B

Para analizar los patrones de resistencia o susceptibilidad de la población de *L. monocytogenes* identificada en la Planta B, se determinaron las MICs de BAC y otros compuestos antimicrobianos (apartado 5.13.1.2) de todos los aislados incluidos en el estudio (tabla 14), y se analizó mediante PCR la presencia del determinante genético de resistencia *bcrABC* y del transposón Tn6188 (apartado 5.14).

6.6.2.1. Fenotipos de resistencia y susceptibilidad

Al analizar la susceptibilidad a BAC, los pulsotipos S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3 resultaron BAC^R, mientras que el pulsotipo S1 resultó BAC^S o BAC^R dependiendo de cada aislado particular, de forma similar a lo observado con el pulsotipo S6 en la Planta A (tabla 11).

La exposición a BAC puede provocar una reducción de la susceptibilidad a otros antimicrobianos, incluidos ciertos antibióticos (Rakic-Martínez *et al.* 2011). Junto con las MICs de BAC, las MICs de otros compuestos revelaron diferentes fenotipos de resistencia múltiple (MDR) entre los subtipos de la Planta B (tabla 11). De forma similar a lo observado con S6 en la planta A (tabla 11), se observó un efecto de la reserpina en las MICs de BAC sólo en los aislados S1. Los aislados BAC^R S1 mostraron

valores superiores que los aislados BAC^S de S1 en las MICs de diferentes compuestos (especialmente de bromuro de etidio) (tabla 11). Las MICs de cloranfenicol y eritromicina no resultaron afectadas (no se muestran los datos). Por su parte, los pulsotipos S2-2, S2-3 y S10-3 mostraron el mismo patrón MDR que S10-1, y no se observó efecto de la reserpina en las MICs de BAC ni aumento en las MICs de EtBr (tabla 11).

6.6.2.2. Genotipos de resistencia a cloruro de benzalconio

El determinante genético *bcrABC* de resistencia a BAC no estaba presente en ninguno de los aislados detectados en la planta B. De forma similar a lo observado en S10-1, el transposón Tn6188 (Müller *et al.* 2013) se encontró en S2-2, S2-3 y S10-3.

Los patrones de resistencia o susceptibilidad de la población de *L. monocytogenes* resistente a BAC de la Planta B, revelaron que los *clusters* 1 y 2 poseían diferentes fenotipos MDR y diferentes genotipos de resistencia a BAC. Por un lado, el pulsotipo S1 es un mutante *prfA* que dependiendo de cada aislado particular, resultó sensible o resistente a BAC, coincidiendo con lo observado previamente en la Planta A con el mutante *prfA* S6 (tabla 11). En el caso de los aislados BAC^R, la sobreexpresión de bombas de expulsión MFS similares a MdrL (Romanova *et al.* 2006, Rakic-Martínez *et al.* 2011), podría estar implicada en el fenotipo de resistencia múltiple de S1 y S6 (tabla 11). De forma similar, la coexistencia de aislados resistentes y sensibles de una misma cepa se ha observado en numerosos estudios clínicos que han demostrado que, en ausencia de antibióticos, la resistencia puede tanto perderse como mantenerse (MacLean y Vogwill 2014). La pérdida de la resistencia (o, lo que es lo mismo, la disminución de la supervivencia de las bacterias resistentes) podría explicarse en términos del coste biológico que la resistencia supone para la competitividad de la bacteria, que puede ocasionar una reducción en la tasa de crecimiento debida a las mutaciones de resistencia. A lo largo del tiempo, sin embargo, la bacteria puede adaptarse y reducir ese coste biológico a través de mutaciones compensatorias que permiten la persistencia de las bacterias resistentes, incluso en ausencia de presión selectiva (MacLean y Vogwill 2014).

Por otro lado, la resistencia a BAC asociada a la presencia del transposón Tn6188 dio lugar a fenotipos de resistencia idénticos en S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3. Ninguno de los cuatro pulsotipos mostró la alta resistencia a EtBr observada en los aislados BAC^R de

S1 (tabla 11). El transposón Tn6188 contiene el gen *qacH*, que se ha descrito que puede reducir la susceptibilidad a los QACs y al EtBr (Müller *et al.* 2014) aunque en esta publicación la diferencia observada en las MICs de EtBr de mutantes en los que el gen *qacH* se había introducido mediante complementación genética y de mutantes en los que dicho gen se había inactivado genéticamente, es de menos de dos veces (Müller *et al.* 2014).

Las cepas de *L. monocytogenes* resistentes a BAC habitualmente muestran una resistencia de bajo nivel a otros compuestos antimicrobianos (tabla 11). En el caso específico de los antibióticos, dicha resistencia múltiple no presenta relevancia clínica (tabla 9). En el ambiente de las plantas de procesado de alimentos, las bombas de expulsión de tipo MDR tampoco confieren a *L. monocytogenes* resistencia a las concentraciones a las que habitualmente se usan los desinfectantes. En las cepas resistentes, las MICs de BAC (entre 10 y 20 mg/l) (tabla 11) fueron muy inferiores a las concentraciones empleadas en la industria (200 mg/l como mínimo) (Tezel y Pavlostathis 2012, Ferreira *et al.* 2014), y, por tanto, los QACs pueden considerarse efectivos para el control de las cepas BAC^R de *L. monocytogenes* (Kastbjerg y Gram 2012). No obstante, los cambios observados deben tenerse en consideración, pues las bombas MDR pueden reducir las concentraciones intracelulares de los antimicrobianos a niveles subinhibitorios que permitirían a la bacteria sobrevivir durante más tiempo que el predecible según la MIC (Piddock 2006). Una resistencia de bajo nivel a BAC puede, por tanto, contribuir a la adaptación y supervivencia de las cepas de *L. monocytogenes* (Carpentier y Cerf 2011) y, en consecuencia, esas cepas resistentes poseen el potencial de transmitirse en los ecosistemas alimentarios.

6.6.3. Formación de *biofilm* en presencia de cloruro de benzalconio de los subtipos de la Planta B

Con objeto de identificar diferencias fenotípicas adicionales entre los nuevos pulsotipos identificados en la Planta B, se analizó la formación de *biofilm* en presencia de BAC mediante un ensayo de tinción con cristal violeta (apartado 5.12.3). En el caso del pulsotipo S2-2 (identificado en más de un aislado), se seleccionó el primer aislado obtenido para la realización del ensayo.

En presencia de 1.25 mg/l de BAC, S2-2, S2-3 y S10-3 formaron un *biofilm* similar al de los controles sin BAC ($P < 0.05$, t de Student), de forma idéntica a lo observado previamente con S10-1 (figura 9, tabla 13), y a diferencia de lo observado con S1 que a

esa misma concentración forma un *biofilm* significativamente menor que los controles sin BAC ($P < 0.05$, t de Student) (figura 9, tabla 13). La influencia del BAC subinhibitorio sobre la formación de *biofilm*, confirmó de nuevo la relación entre los subtipos portadores del transposón Tn6188.

6.6.4. Análisis de las secuencias genómicas de cinco aislados resistentes a cloruro de benzalconio

Mediante la técnica de secuenciación aleatoria del genoma completo (WGS, *Whole-genome Shotgun Sequencing*) (apartado 5.8.2), se determinaron las secuencias genómicas preliminares de cinco aislados BAC^R procedentes de las dos plantas estudiadas (Plantas A y B), correspondientes a los pulsotipos S1, S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3 (tabla 15). Las secuencias fueron analizadas y comparadas con el fin de determinar sus genotipos de resistencia, y de identificar a nivel molecular posibles características relacionadas con la persistencia ambiental de estos subtipos.

6.6.4.1. Características generales de las secuencias genómicas

Los resultados más relevantes del proceso de obtención, ensamblado, anotación y análisis de las secuencias se muestran en la tabla 15. Para todas las secuencias, el contenido en G+C (38%) y el tamaño (2997-3114 kb) se encontraron dentro de los valores habituales de los genomas de *L. monocytogenes* (Glaser *et al.* 2001, den Bakker *et al.* 2013, Kuenne *et al.* 2013). Las secuencias de S1 y S10-1 resultaron, sin embargo, menores y con un menor número de regiones codificantes (CDS) que las de S2-2, S2-3 y S10-3.

6.6.4.2. Identificación *in silico* de subtipos basados en las secuencias de múltiples genes

El análisis *in silico* de las secuencias de los cinco aislados mediante MLST asignó a S1 el perfil alélico o tipo de secuencia (ST, *sequence type*) ST31 (*abcZ-7*, *bglA-14*, *cat-10*, *dapE-19*, *dat-9*, *ldh-8* y *lhkA-1*), y a S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3, el perfil alélico ST121 (*abcZ-7*, *bglA-6*, *cat-8*, *dapE-8*, *dat-6*, *ldh-37* y *lhkA-1*) (tabla 15). Los cuatro pulsotipos ST121 portadores del transposón Tn6188 pueden, por tanto, considerarse representantes de un mismo genotipo BAC^R.

Tabla 15. Características más relevantes de los genomas secuenciados.

Característica	Pulsotipo de la cepa utilizada				
	S1	S10-1	S2-2	S2-3	S10-3
Planta de procesado	A	A	B	B	B
Año de aislamiento	2008	2008	2010	2010	2010
Cobertura de la secuenciación	282	291	259	314	254
Nº de secuencias <i>contigs</i>	51	70	73	52	71
Contenido G+C (%)	38	38	38	38	38
Longitud total de todos los <i>contigs</i> (kb) ^a	2997	3009	3114	3112	3086
Nº de secuencias codificantes (CDS) ^b	3044	2972	3108	3115	3069
Tipo de secuencia (ST)	31	121	121	121	121

^a Datos obtenidos tras el filtrado y ensamblaje con Spades. ^b Datos obtenidos con RAST.

En la base de datos del Instituto Pasteur de París (actualizada el 03/03/2015) se encuentran 10 cepas ST31 y 69 cepas ST121 (la mayoría de serotipo 1/2a). El perfil ST121, aislado de forma persistente en alimentos y en el ambiente de las plantas de procesado de alimentos de diferentes países (Ragon *et al.* 2008, Hein *et al.* 2011, Holch *et al.* 2013, Ciolacu *et al.* 2014), se encuentra entre las seis STs de *L. monocytogenes* más prevalentes a nivel mundial (Schoder *et al.* 2014). En España, el perfil ST121 resultó el segundo más abundante entre los aislados procedentes de diferentes productos cárnicos y superficies en contacto con los mismos, en un estudio realizado durante varios años en diferentes plantas de procesado de carne (Martín *et al.* 2014). *L. monocytogenes* ST121 también resultó el perfil alélico más abundante entre los aislados de carne y productos cárnicos confiscados en un aeropuerto, procedentes de diferentes países (Schoder *et al.* 2014). Según todos estos resultados y los del presente estudio, el perfil ST121 parece estar bien adaptado para colonizar el ambiente de las industrias cárnicas, incluidas las áreas sometidas a una intensa limpieza y desinfección, como las áreas de post-procesado.

Las cepas con la misma ST pueden presentar similitudes en genes necesarios para su supervivencia en los alimentos y el ambiente de las plantas de procesado de los alimentos (Orsi *et al.* 2011, Ciolacu *et al.* 2014). Las cepas ST121 presentan con frecuencia una proteína InlA truncada asociada a una atenuación de la virulencia (Ragon

et al. 2008, Ciolacu *et al.* 2014). Por su parte, el perfil ST31 presenta una reducida virulencia potencial debida a mutaciones en InlA y PrfA (Roche *et al.* 2012).

En el estudio de Roche *et al.* (2012), se identificaron un conjunto de cepas de *L. monocytogenes* con diferentes genotipos de virulencia reducida que se distribuyeron en tres STs estrechamente relacionados: ST13, ST31 y ST193. Todas las cepas con perfil ST31 presentaron mutaciones en InlA, y la mitad de ellas también la delección PrfA Δ 174-237. Esta delección, identificada en los pulsotipos S1 y S6, se ha descrito en otros mutantes *prfA* similares identificados como persistentes en otras plantas de procesado (Lindbäck *et al.* 2011, López *et al.* 2013).

6.6.4.3. Análisis comparativo de los genomas secuenciados

Para visualizar la conservación y variación global de los cinco genomas secuenciados, se realizó el alineamiento con MAUVE.

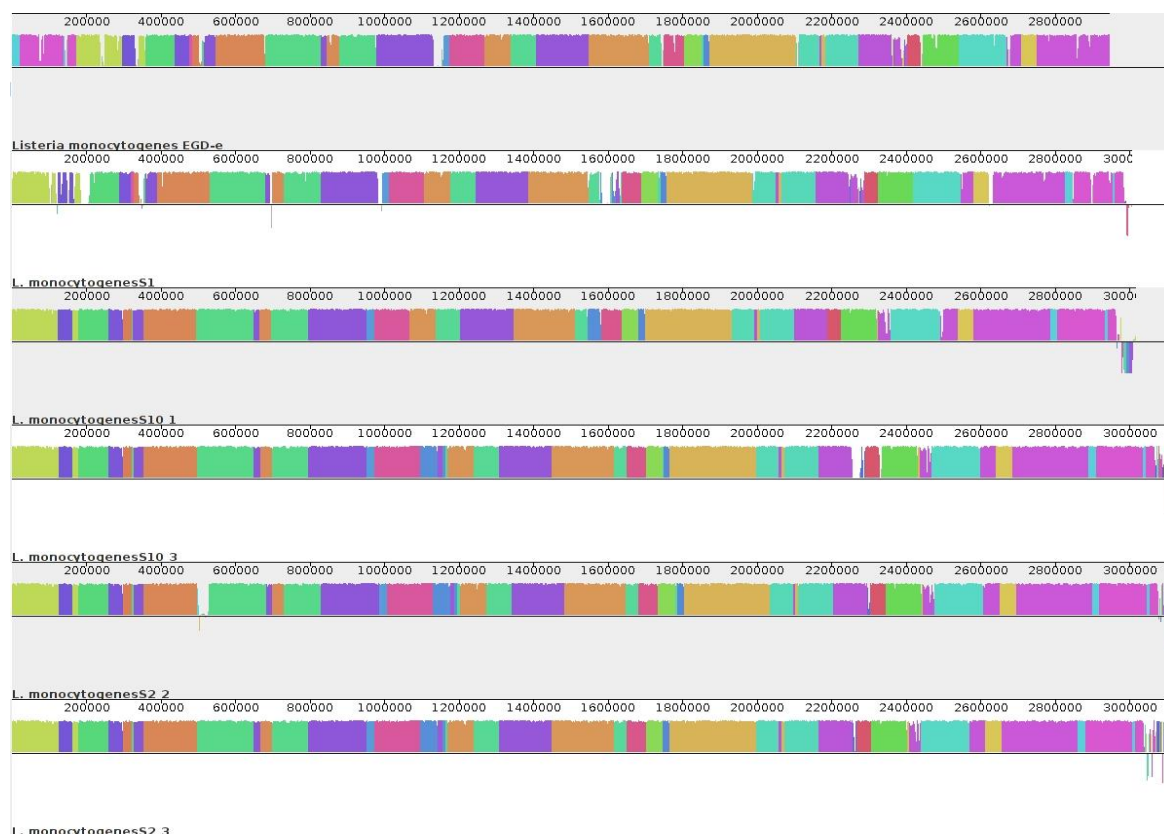
La figura 12 presenta el alineamiento múltiple de las secuencias genómicas de S1, S10-1, S10-3, S2-2 y S2-3, empleando como referencia el genoma de *L. monocytogenes* EGD-e (número de acceso en GenBank NC_003210.1).

En esta figura el alineamiento se representa como bloques alineados locales (LCBs, *local collinear blocks*) que si están coloreados indican que son secuencias con gran similitud. Inversamente, las porciones blancas identifican secuencias de baja similitud. Las regiones invertidas están representadas como bloques por debajo de la línea central del genoma.

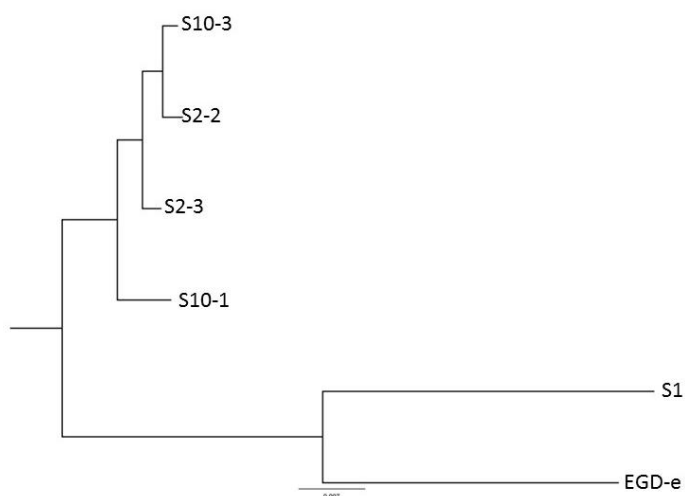
Al tratarse de genomas ensamblados *de novo* y no circularizados, las regiones completamente blancas no están alineadas con MAUVE y probablemente representan regiones no secuenciadas en uno o más genomas, o bien delecciones/inserciones, o fragmentos del genoma reemplazados por una secuencia no homóloga. De forma global, todos los genomas secuenciados eran muy similares (figura 12) si bien es de destacar especialmente la gran similitud de los cuatro genomas ST121 con una media de identidad de nucleótidos en sus genomas de 99.7%.

Figura 12. Alineamiento múltiple de los genomas de cinco cepas de *L. monocytogenes* de los pulsotipos S1, S10-1, S10-3, S2-2 y S2-3. El alineamiento (a) se generó con la herramienta bioinformática MAUVE y el árbol guía (b) mediante el método Neighbor Joining.

(a)



(b)



El número de genes específicos de cada genoma se estudió comparando los genomas por pares mediante el algoritmo BLAT. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 16. Las cepas S2-2, S2-3 y S10-3 presentaron una gran similitud (entre un 0.26% y un 0.96% de genes no compartidos). La cepa S10-1, en cambio, mostró una similitud menor con las otras tres cepas ST121 (entre un 3.2% y un 4.1% de genes no compartidos). Las mayores diferencias se encontraron entre las cuatro cepas ST121 y la cepa ST31 (entre un 5.11% y un 8.04% de genes no compartidos).

Tabla 16. Comparación por parejas de los genomas secuenciados.

Genoma analizado ^a	Genoma comparado				
	S1	S10-1	S10-3	S2-2	S2-3
S1	-	160 ^b	146	147	157
	-	5.25% ^c	4.79%	4.82%	5.15%
S10-1	152	-	14	14	12
	5.11%	-	0.47%	0.47%	0.40%
S10-3	250	126	-	9	24
	8.04%	4.05%	-	0.28%	0.77%
S2-2	251	129	12	-	30
	8.05%	4.14%	0.38%	-	0.96%
S2-3	219	100	8	13	-
	7.13%	3.20%	0.26%	0.42%	-

^a Resultados obtenidos utilizando el algoritmo BLAT. Cada fila representa el genoma de la cepa que se analiza frente al genoma de la cepa con la que se compara, indicado en la columna. ^b Número de genes no compartidos por cada genoma analizado frente al genoma comparado. La intensidad de color de las celdas aumenta al aumentar el número de genes no compartidos. ^c Porcentaje de genes no compartidos respecto al número total de genes en cada genoma analizado.

Para estudiar la similitud de los genes compartidos en los genomas analizados se realizó el análisis de polimorfismos de una sola base (SNPs) utilizando el programa bioinformático Mummer. Los resultados de los SNPs encontrados en los genomas analizados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Polimorfismos y secuencias accesorias identificados en los genomas secuenciados.

	Cepa				
	S1	S10-1	S10-3	S2-2	S2-3
No. de SNPs comparando con EGD-e ^a	32612	38264	38393	38413	38386
No. de SNPs comparando con S10-1 ^a	39721	0	73	75	73
No. de SNPs comparando con S2-2 ^a	40064	75	11	0	4
No. of SNPs comparando con S10-3 ^a	40065	73	0	11	4
No. de SNPs comparando con S2-3 ^a	40060	73	4	4	0
<i>bcrABC</i>	-	-	-	-	-
Tn6188	-	+	+	+	+
Nº de secuencias de profagos ^b	1	1	3	4	3
profago <i>comk</i>	+	-	+	+	+
profago tRNA-Arg-CCG	-	+	+	+	+
profago tRNA-Arg-TCT	-	-	+	+	+
Plásmido ST121 ^c	-	+	+	+	+
Tamaño del plásmido ST121 (pb)	-	62492	61210	61124	61124
Tn5422 (<i>cadA1</i>)	+	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d
Isleta de supervivencia al estrés SSI-1	+	-	-	-	-
Repeticiones CRISPR_1 (<i>lmo0517/lmo0518</i>) ^e	+	+	+	+	+
Repeticiones CRISPR_2 (<i>lmo2591/lmo2595</i>) ^e	-	+	+	+	+

^a Datos obtenidos con Mummer. ^b Datos obtenidos con PHAST. ^c Descrito en Schmitz-Esser *et al.* (2015). ^d En el plásmido. ^e Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

El reducido número de SNPs identificado tras la comparación del genoma de la cepa S10-1 con el genoma de las cepas S2-2, S2-3 y S10-3 (entre 73 y 75 SNPs), indicaba una gran similitud en los genes compartidos entre los cuatro genomas ST121. Especialmente en la comparación entre S2-2, S2-3 y S10-3, se identificaron de 4 a 11 SNPs. En cambio, en la comparación de los genomas ST121 frente al genoma de referencia de *L. monocytogenes* EGD-e y al genoma de la cepa S1, el número de SNPs identificados variaba entre 38264 y 40065.

Con la finalidad de estudiar las características de los genomas secuenciados se realizó la anotación automática de las regiones CDS identificadas en cada genoma con la aplicación SEED a través del servidor RAST (Overbeek *et al.* 2014). SEED identifica

en cada genoma lo que denomina “subsistemas”, agrupando las regiones CDS que corresponden a proteínas relacionadas funcionalmente. Los resultados de los cinco genomas de este estudio se muestran en la figura 13.

Al comparar la cepa S1 y las cuatro cepas ST121, se encontraron diferencias en los subsistemas de “cofactores, vitaminas y grupos prostéticos”, “pared celular y cápsula”, “división celular y ciclo celular”, “aminoácidos” y “carbohidratos”. Las regiones CDS previstas de los cinco genomas analizados (figura 13), junto con el número de SNPs (tabla 17) y la comparación del contenido de genes (tabla 16, figura 12), confirmaron las diferencias entre la cepa S1 y las cuatro cepas ST121.

Las mayores diferencias entre las cepas S1 y S10-1 con respecto a las cepas S2-2, S2-3 y S10-3 se encontraron en el genoma accesorio, que incluye el subsistema “profagos, fagos, elementos transponibles y plásmidos”. A pesar de las diferencias que se encontraron entre las cuatro cepas ST121 (S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3), también se identificaron plásmidos, transposones y profagos conservados que se presentan en la tabla 17. Por ejemplo, y coincidiendo con los datos publicados sobre la mayoría de las cepas ST121 (Schmitz-Esser *et al.* 2015) se encontró un plásmido conservado en los cuatro genomas ST121 (tabla 17).

Las diferencias en genes codificadores de proteínas propias de bacteriófagos entre las cepas analizadas, se confirmó con los resultados del análisis mediante PHAST, con el que se identificó el número y tipo de posibles profagos de las diferentes secuencias genómicas (tabla 15). En S10-3, S2-2 y S2-3, las regiones de profagos se encontraban separadas en diferentes *contigs*, que aparecen al final de las secuencias alineadas con MAUVE (figura 12), lo que destaca la dificultad para ensamblar esas regiones.

En las secuencias de la cepa S1 y de tres de las cepas ST121 (S2-2, S2-3 y S10-3), se encontró un profago integrado en el gen *comK* (que codifica para un factor de transcripción de la competencia). En S1 la inserción del profago era de 42.3 kb, pero en las tres cepas restantes el tamaño de la inserción no se pudo calcular, por encontrarse en varios *contigs* que no se pudieron ensamblar juntos. En los cuatro genomas ST121 se encontró otro profago diferente, con un gran número de regiones homólogas al fago A118 de *Listeria*, insertado tras el tRNA-Arg-CCG. También en S2-2, S2-3 y S10-3, se encontró otro profago con regiones homólogas al fago LP-101 de *Listeria*, insertado tras el tRNA-Arg-TCT (tabla 17) (Schmitz-Esser *et al.* 2015).

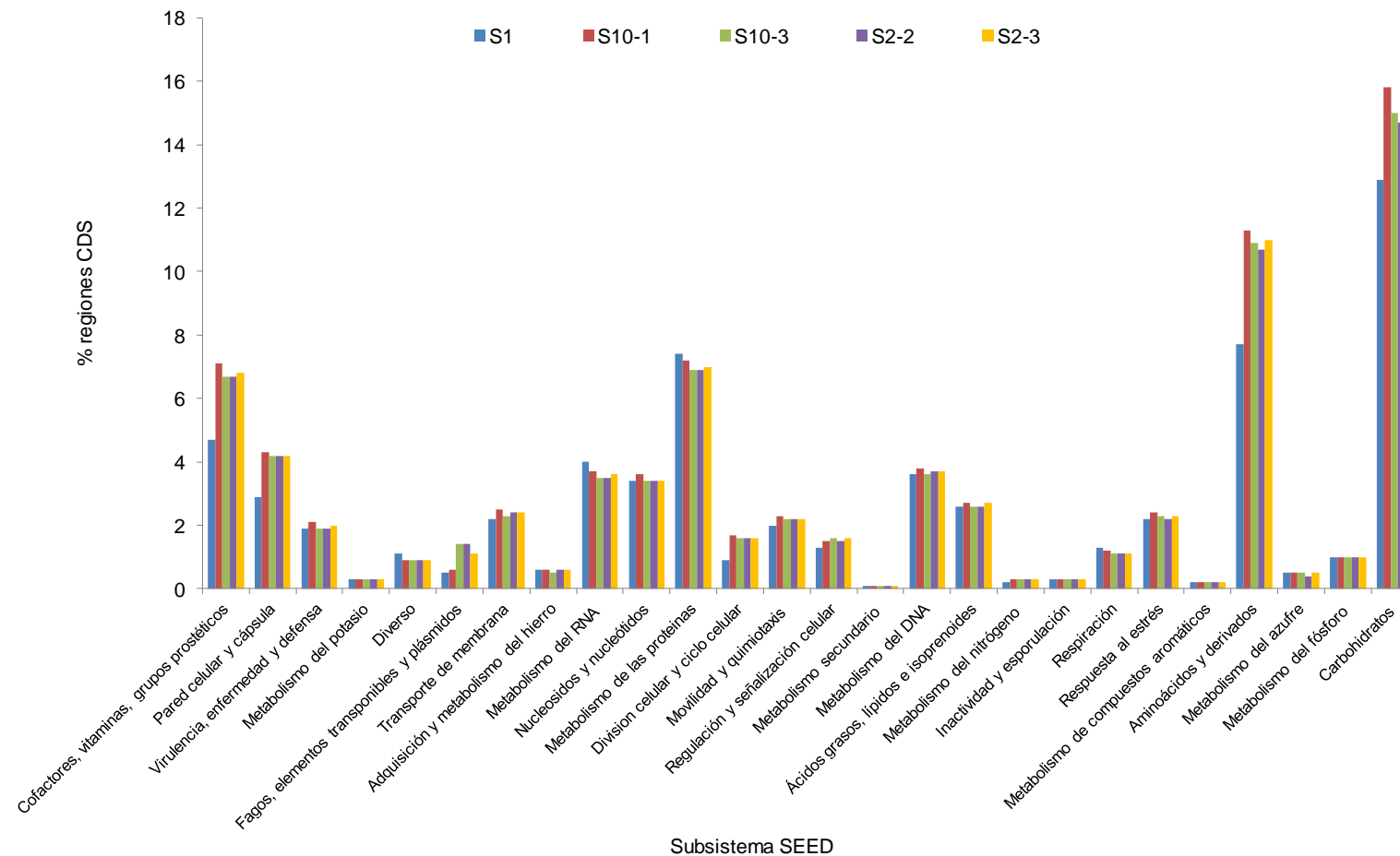


Figura 13. Porcentaje de regiones genómicas con función conocida encontradas en los genomas de las cepas de *L. monocytogenes*. La anotación de la función de las regiones genómicas se realizó utilizando la herramienta SEED.

Diferentes estudios han demostrado la importancia de los bacteriófagos en la evolución de cepas estrechamente relacionadas de *L. monocytogenes* (Kathariou *et al.* 2006, Orsi *et al.* 2008, Gilmour *et al.* 2010, Laksanalamai *et al.* 2012). El análisis de las secuencias genómicas puede revelar la existencia de regiones de profagos capaces de explicar las pequeñas diferencias de poblaciones que siendo filogenéticamente similares presentan diferentes perfiles de PFGE (Stasiewicz *et al.* 2015). En el presente estudio, las diferencias en los perfiles de PFGE de las cuatro cepas incluidas en el *cluster* 2 y que eran portadoras del transposón Tn6188 (S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3), se asoció con un aumento del tamaño de las secuencias genómicas. La secuencia de la cepa S10-3 contenía secuencias de tres profagos y contenía 104 kpb más que la secuencia de S10-1, que sólo contenía un profago (tabla 15). Esto sugiere que la diferencia de tamaño de las secuencias genómicas de las cepas ST121 probablemente se debe a su contenido en profagos.

Los fagos influyen marcadamente en las redes ecológicas de las comunidades bacterianas, actuando como reservorios de diversidad genética (Fortier y Sekulovic 2013). Dentro del género *Listeria*, los profagos constituyen la mayor fuente de diversidad (den Bakker *et al.* 2013, Kuenne *et al.* 2013), y pueden suponer hasta el 7% de los genes codificadores (Glaser *et al.* 2001). Los bacteriófagos también juegan un importante papel en la adquisición de rasgos que favorecen la capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes* (den Bakker *et al.* 2013, Kuenne *et al.* 2013). Por ejemplo, los fagos insertados en el gen *comK* pueden influir en la capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos (Orsi *et al.* 2008), favoreciendo su rápida adaptación a nichos específicos, la formación de *biofilm* o la persistencia (Verghese *et al.* 2011). En el presente trabajo, la secuencia de un profago insertado en el gen *comK* se detectó en todas las cepas excepto en S10-1 (tabla 17). De acuerdo con lo publicado previamente, en la mayoría de las cepas ST121 no se encuentran profagos insertados en *comK* (Schmitz-Esser *et al.* 2015). Las cepas de *L. monocytogenes* sin la inserción en *comK*, como S10-1, pueden evolucionar hacia la adquisición de un profago en *comK*, que potencialmente puede estar implicado en su mecanismo de persistencia (Verghese *et al.* 2011).

Las tres cepas diferentes, pero estrechamente relacionadas, del *cluster* 2 de la Planta B (S2-2, S2-3 y S10-3) probablemente evolucionaron a partir de la cepa S10-1, antes o después de su transmisión desde la Planta A. Esta especulación se basa en el reducido

número de SNPs y en la presencia variable de secuencias de fagos en esas cepas (tabla 15). Tanto los SNPs, que representan la diversificación, como las secuencias de los fagos, probablemente adquiridos de poblaciones bacterianas del mismo ambiente (Gilmour *et al.* 2010), pueden estar relacionados con el estrés provocado por los desinfectantes. La exposición a los antimicrobianos puede provocar daños en el DNA e inestabilidad genómica; esta inestabilidad finalmente da lugar a mutaciones que incluyen bien SNPs o bien reorganizaciones del genoma debidas a elementos genéticos móviles (Shapiro 2015).

Los resultados del análisis comparativo de las cinco secuencias genómicas, sugiere también que las dos STs se encontraban equipados con diferentes genes de resistencia a los antimicrobianos y al estrés. Las cuatro cepas ST121 contenían el transposón Tn6188, que podría estar relacionado con su capacidad para sobrevivir en presencia de los QACs. Este transposón de resistencia a BAC se encuentra en todos los genomas secuenciados pertenecientes a ST121 (Schmitz-Esser *et al.* 2015). Además, con frecuencia los plásmidos son portadores de genes que permiten a la bacteria sobrevivir al estrés ambiental. Las cuatro cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al subtipo ST121 presentaban un plásmido (tabla 17), que incluye el transposón de resistencia al cadmio Tn5422 (Lebrun *et al.* 1994, Kuenne *et al.* 2013) y el gen *clpL*, que probablemente proporciona un potencial adicional de respuesta al estrés a las cepas ST121 (Schmitz-Esser *et al.* 2015). Un transposón como el Tn5422 asociado con el gen *cadA1* de resistencia al cadmio se identificó también en S1 (tabla 17). En cambio, la persistencia particularmente prolongada de la cepa S1, podría estar relacionada con la presencia de una región idéntica a la llamada “Isleta 1 de supervivencia al estrés” (SSI-1, *stress survival islet 1*), relacionada con una elevada resistencia a diversos tipos de estrés en determinadas cepas de *L. monocytogenes* (Hein *et al.* 2011).

7. CONCLUSIONES

1. A lo largo de tres años, se analizaron las rutas de contaminación de *Listeria monocytogenes* en una planta de sacrificio y elaboración de productos de cerdo ibérico (Planta A). La caracterización molecular de las cepas permitió identificar 29 pulsotipos diferentes, ocho de los cuales se consideraron persistentes. La distribución en el ambiente y en los productos de los tres pulsotipos predominantes generó patrones de contaminación específicos de cada uno de esos pulsotipos, que mostraron respuestas diferentes ante las medidas correctoras que se adoptaron en la planta. Estos resultados destacan la importancia de la caracterización molecular de los subtipos de *L. monocytogenes* para identificar las rutas de contaminación específicas de la planta, que permitieron mejorar las estrategias de control de la contaminación.
2. Cuatro cepas de *L. monocytogenes* de diferente serotipo y aisladas a partir de los productos procedentes de la Planta A, se emplearon para comparar la actividad antilisteria a baja temperatura de dos cultivos protectores mediante un ensayo rápido que simula el inicio de la fermentación del chorizo ibérico. El preparado comercial BactoformTM F-LC ejerció un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, mientras que *Lactobacillus sakei* CTC494 mostró un efecto bactericida. *L. sakei* CTC494 podría considerarse, por tanto, un buen candidato para mejorar el control de *L. monocytogenes* en el proceso tradicional de elaboración a baja temperatura de los embutidos ibéricos curados, ya que puede ser empleado tanto como cultivo protector como cultivo iniciador.
3. Al analizar la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos de los pulsotipos identificados en la Planta A, dos cepas resultaron resistentes a BAC y las 29 cepas resultaron sensibles a un grupo de antibióticos empleados habitualmente por su actividad sobre bacterias Gram-positivas. Estos resultados demuestran que las cepas BAC^R de *L. monocytogenes* pueden no presentar resistencia cruzada a los antibióticos, y que en determinadas poblaciones de *L. monocytogenes* todavía es posible detectar una sensibilidad uniforme a los antibióticos.
4. La resistencia a BAC estaba asociada significativamente con la “supervivencia” prolongada de determinadas cepas en el ambiente de la Planta A, en la que los QACs se emplearon con mayor frecuencia a partir del segundo año. Todos los pulsotipos “supervivientes” BAC^R pertenecían al serotipo molecular 1/2a. La selección de cepas de *L. monocytogenes* de serotipo 1/2a resistentes a

- concentraciones subletales de BAC más elevadas podría estar asociada con el aumento del empleo de los QACs en la planta.
5. Al analizar la producción de *biofilm* por las cepas de serotipo 1/2a detectadas en la Planta A, las cepas BAC^R mostraron una formación de *biofilm* significativamente inferior que las cepas BAC^S en ausencia de BAC, independientemente de la tasa de crecimiento. En presencia de BAC, una de las cepas “supervivientes” BAC^R, portadora del determinante genético de resistencia a BAC Tn6188, era capaz de formar *biofilm* a una concentración de BAC que impedía la formación de *biofilm* al resto de las cepas. La presencia de concentraciones subinhibitorias de BAC podría representar una ventaja para las cepas portadoras del transposón Tn6188, ya que compensaría el bajo nivel del *biofilm* asociado a su resistencia.
 6. Las bases de la persistencia de *L. monocytogenes* se investigaron también en una nueva planta de procesamiento de productos RTE perteneciente a la misma empresa (Planta B). La secuenciación del genoma completo y el análisis MLST *in silico* de diferentes aislados BAC^R mostró importantes diferencias genómicas entre dos grupos de cepas: el mutante PrfA S1 (tipo MLST ST31) y las cepas portadoras del Tn6188 (tipo MLST ST121). Ambos tipos se identificaron como contaminantes persistentes en la Planta A y posteriormente se detectaron en muestras ambientales procedentes de las superficies limpias y desinfectadas de la Planta B. La resistencia de bajo nivel a los desinfectantes detectada en ambos grupos de cepas, indica que en el ambiente de las plantas de procesamiento de alimentos pueden seleccionarse subtipos resistentes y que dicha resistencia podría asociarse al fenotipo de persistencia.

Los resultados de este estudio proporcionan nuevos datos acerca de los mecanismos que permiten a *L. monocytogenes* sobrevivir en presencia de concentraciones subinhibitorias de uno de los tipos de desinfectantes que se emplea de forma extensiva en la industria alimentaria.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aase B, Sundheim G, Langsrud S, Rørvik LM. (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*;62:57-63.
- Angiuoli SV, Gussman A, Klimke W, Cochrane G, Field D, Garrity G, Kodira CD, Kyrpides N, Madupu R, Markowitz V, Tatusova T, Thomson N, White O. (2008) Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS*;12:137-41.
- Aparecida de Oliveira M, Abeid Ribeiro EG, Morato Bergamini AM, Pereira De Martinis EC. (2010) Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. *Food Microbiol*;27:19-23.
- Asano K, Sashinami H, Osanai A, Asano Y, Nakane A. (2011) Autolysin amidase of *Listeria monocytogenes* promotes efficient colonization of mouse hepatocytes and enhances host immune response. *Int J Med Microbiol*;301:480-7.
- Autio T, Säteri T, Fredriksson-Ahomaa M, Rahkio M, Lundén J, Korkeala H. (2000) *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. *J Food Prot*;63:1438-42.
- Autio T, Markkula A, Hellström S, Niskanen T, Lundén J, Korkeala H. (2004) Prevalence and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in the tonsils of pigs. *J Food Prot*;67:805-8.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*;9:75.
- Baranyi J, Pin C. (1999) Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl Environ Microbiol*;65:732-6.
- Bécavin C, Bouchier C, Lechat P, Archambaud C, Creno S, Gouin E, Wu Z, Kühbacher A, Brisse S, Pucciarelli MG, García-del Portillo F, Hain T, Portnoy DA, Chakraborty T, Lecuit M, Pizarro-Cerdá J, Moszer I, Bierne H, Cossart P. (2014) Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity. *M Bio*;5:e00969-14.
- Benkerroum N, Daoudi A, Kamal M. (2003) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture. *Meat Science*, 63:479-484.
- Benkerroum N, Daoudi A, Hamraoui T, Ghalfi H, Thiry C, Duroy M, Evrart P, Roblain D, Thonart P. (2005) Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis subsp. lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *J Appl Microbiol*;98:56-63.
- Benito MJ, Martín A, Aranda E, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, Córdoba MG. (2007) Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *J Food Sci*;72:193-201.

- Bergholz TM, Moreno Switt AI, Wiedmann M. (2014) Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? *Trends Microbiol*;22:275-81.
- Berrang ME, Meinersmann RJ, Frank JF, Ladely SR. (2010) Colonization of a newly constructed commercial chicken further processing plant with *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*;73:286-91.
- Bērziņš A, Hellström S, Siliņš I, Korkeala H. (2010) Contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked pork processing. *J Food Prot*;73:2103-9.
- Bille J, Blanc DS, Schmid H, Boubaker K, Baumgartner A, Siegrist HH, Tritten ML, Lienhard R, Berner D, Anderau R, Treboux M, Ducommun JM, Malinverni R, Genné D, Erard PH, Waespi U. (2006) Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Euro Surveill*;11:91-3.
- Bisbiroulas P, Psylou M, Iliopoulou I, Diakogiannis I, Berberi A, Mastronicolis SK. (2011) Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Lett Appl Microbiol*;52:275-80.
- Borucki MK y Call DR. (2003) *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J Clin Microbiol*;41:5537-40.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. (2003) Variation in *biofilm* formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*;69:7336-42.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*;27:1017-32.
- Briers Y, Klumpp J, Schuppler M, Loessner MJ. (2011) Genome sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a clinical isolate from a food-borne listeriosis outbreak. *J Bacteriol*;193:4284-5.
- Brosch R, Brett M, Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyi B, Rocourt J. (1996) Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int J Food Microbiol*;32:343-55.
- Bruhn JB, Vogel BF, Gram L. (2005) Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments. *Appl Environ Microbiol*;71:961-7.
- Buncic S, Avery SM, Rocourt J, Dimitrijevic M. (2001) Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int J Food Microbiol*;65:201-12.
- Cabanes D, Dussurget O, Dehoux P, Cossart P. (2004) Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol*;51:1601-14.
- Cabedo L, Picart i Barrot L, Teixidó i Canelles A. (2008) Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *J Food Prot*; 71:855-9.
- Call DR, Borucki MK, Besser TE. (2003) Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol*;41:632-9.

- Capita R, Alonso-Calleja C. (2013) Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr*;53:11-48.
- Capita R, Riesco-Peláez F, Alonso-Hernando A, Alonso-Calleja C. (2014) Exposure of *Escherichia coli* ATTC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials and ultrastructure. *Appl Environ Microbiol*;80:1268-80.
- Carpentier B, Cerf O. (2011) Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol*;145:1-8.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention. (2008) Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy--Massachusetts, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*;57:1097-100.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention. (2011) Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe--United States, August-September 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*;60:1357-8.
- CFSAN Center for Food Safety and Applied Nutrition, FSIS Food Safety and Inspection Service. (2003) Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. U.S. Food and Drug Admin. (FDA) and U.S. Dept. of Agriculture (USDA). <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/ucm183966.htm>. Accessed 22 June 2015.
- Ciolacu L, Nicolau AI, Wagner M, Rychli K. (2015) *Listeria monocytogenes* isolated from food samples from a Romanian black market show distinct virulence profiles. *Int J Food Microbiol*;209:44-51.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Clinical and Laboratory Standards Institute, Approved Standard, third ed. CLSI, Wayne, PA. CLSI document M31-A3.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard, 11th ed. CLSI Document M02-A11. Wayne, PA.
- Coffey A, Rombouts FM, Abee T. (1996) Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol*;62:1252-6.
- Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC, Berche P. (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun*;57:3629-36.
- Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, Ross RP, Hill C. (2008) Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*;4:e1000144.
- Charpentier E, Gerbaud G, Jacquet C, Rocourt J, Courvalin P. (1995) Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J Infect Dis*;172:277-81.
- Charpentier E, Courvalin P. (1999) Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob Agents Chemother*;43:2103-8.

- Chasseignaux E, Toquin MT, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G. (2001) Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. J Appl Microbiol;91:888-99.
- Chasseignaux E, G rault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G. (2002) Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiol Lett;210:271-5.
- Chen Y y Knabel SJ. (2008) Strain typing. En: Handbook of *Listeria monocytogenes* (ed. Liu D). CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU., p ags 203-240.
- Chen BY, Pyla R, Kim TJ, Silva JL, Jung YS. (2010) Incidence and persistence of *Listeria monocytogenes* in the catfish processing environment and fresh fillets. J Food Prot;73:1641-50.
- Choi YM, Park HJ, Jang HI, Kim SA, Imm JY, Hwang IG, Rhee MS. (2013) Changes in microbial contamination levels of porcine carcasses and fresh pork in slaughterhouses, processing lines, retail outlets, and local markets by commercial distribution. Res Vet Sci;94:413-8.
- Da Silva Fernandes M, Kabuki DY, Kuaye AY. (2015) Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. Int J Food Microbiol;200:5-12.
- Darling AE, Mau B, Perna NT. (2010) progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS One. 2010 Jun 25;5(6):e11147.
- Dass SC, Abu-Ghannan N, Antony-Babu S, Cummins EJ. (2010) Ecology and molecular typing of *L. monocytogenes* in a processing plant for cold-smoked salmon in the Republic of Ireland. Food Research Int;43:1529-36.
- Davenport KW, Daligault HE, Minogue TD, Bishop-Lilly KA, Bruce DC, Chain PS, Coyne SR, Frey KG, Jaissle J, Koroleva GI, Ladner JT, Li PE, Palacios GF, Redden CL, Scholz MB, Teshima H, Johnson SL. (2014) Whole-Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* Type Strain 53 XXIII. Genome Announc;2. pii: e00970-14.
- Den Bakker HC, Didelot X, Fortes ED, Nightingale KK, Wiedmann M. (2008) Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*. BMC Evol Biol;8:277.
- Den Bakker HC, Desjardins CA, Griggs AD, Peters JE, Zeng Q, Young SK, Kodira CD, Yandava C, Hepburn TA, Haas BJ, Birren BW, Wiedmann M.(2013). Evolutionary dynamics of the accessory genome of *Listeria monocytogenes*. PLoS One;8:e67511.
- Den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, Stasiewicz MJ, Burrell A, Roof S, Strawn LK, Fortes E, Nightingale KK, Kephart D, Wiedmann M. (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol;64:1882-9.
- Delcher AL, Salzberg SL, Phillippy AM. (2003) Using MUMmer to identify similar regions in large sequence sets. Curr Protoc Bioinformatics;10.

- Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Ianieri A. (2008) Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol*;1552-61.
- Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*;68:2950-8.
- DOUE. (2004) Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios (DOUE de 30 de abril de 2004, L139/1).
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*;42:3819-22.
- Doumith M, Jacquet C, Gerner-Smidt P, Graves LM, Loncarevic S, Mathisen T, Morvan A, Salcedo C, Torpdahl M, Vazquez JA, Martin P. (2005) Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *J Food Prot*;68:2648-50.
- Drenkard E, Ausubel FM. (2012) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*;416:740-3.
- Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol*;58:587-610.
- Dutta V, Elhanafi D, Kathariou S. (2013) Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette *bcrABC* in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*;79:6067-74.
- Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GD, Leppard GG, Hitchcock AP. (2009) Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can J Microbiol*;55:163-78.
- EFSA European Food Safety Authority. (2013) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat (RTE) foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA J*;11:324.
- EFSA European Food Safety Authority, ECDC European Centre for Disease Prevention and Control. (2015) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13:3991. (www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991.htm)
- Elhanafi D, Dutta V, Kathariou S. (2010) Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl Environ Microbiol*;76:8231-8.
- Encinas JP, Sanz JJ, García-López ML, Otero A. (1999) Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *Int J Food Microbiol*;46:167-171.

- Ennahar S, Deschamps N, Richard J. (2000) Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Current Microbiol*;41:1–4.
- Ericsson H, Eklöw A, Danielsson-Tham ML, Loncarevic S, Mentzing LO, Persson I, Unnerstad H, Tham W. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J Clin Microbiol*;35:2904-7.
- Ermolaeva S, Karpova T, Novella S, Wagner M, Scortti M, Tartakovskii I, Vazquez-Boland JA. (2003) A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. *Int J Food Microbiol*;82:87-94.
- EUCAST European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2000) EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect*;6:503-8.
- EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2013) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 3.1. Available at: <http://www.eucast.org>, accessed August 2, 2013.
- Facinelli B, Giovanetti E, Varaldo PE, Casolari P, Fabio U. (1991) Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*. *Lancet*;338:1272.
- Farber JM, Peterkin PI. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*;55:476-511.
- Farber JM, Pagotto F, Scherf C. (2007) Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: *Listeria, listeriosis and food safety* (eds. Ryser ET y Mart EH). CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU., págs. 503-570.
- FDA U.S. Food and Drug Administration (2015). Whole genome sequencing program.<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/ucm363134.htm>.
- Ferreira V, Barbosa J, Stasiewicz M, Vongkamjan K, Moreno Switt A, Hogg T, Gibbs P, Teixeira P, Wiedmann M. (2011) Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. *Appl Environ Microbiol*;77:2701-15.
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, Stasiewicz MJ. (2014) *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot.*;77:150-70.
- Foegeding PM, Thomas AB, Pilkington DH, Klaenhammer TR. (1992) Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl Environ Microbiol*;58: 884-890.
- Folsom JP, Siragusa GR, Frank JF. (2006) Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.*;69:826-34.
- Fortier LC, Sekulovic O. (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*;4:354-65.
- Fox EM, Leonard N, Jordan K. (2011) Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*;77:6559-69.

- Fox EM, Solomon K, Moore JE, Wall PG, Fanning S. (2014) Phylogenetic profiles of in-house microflora in drains at a food production facility: comparison and biocontrol implications of *Listeria*-positive and -negative bacterial populations. *Appl Environ Microbiol*;80:3369-74.
- Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P, Ruppitsch W, Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Appl G, Werber D, Stark K, Prager R, Flieger A, Karpísková R, Pfaff G, Allerberger F. (2010) Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro Surveill*;15: 19543.
- Fugett EB, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *J Clin Microbiol*;45:865-73.
- Gandhi M, Chikindas ML. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbio*;113:1-15.
- Gaulin C, Ramsay D, Bekal S. (2012) Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, quebec, Canada, 2008. *J Food Prot*;75:71-8.
- Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev*;29:851-75.
- Gianfranceschi M, Gattuso A, Tartaro S, Aureli P. (2003) Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. *Eur J Epidemiol*;18:1001-6.
- Gilbert P, McBain AJ. (2003) Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*;16:189-208.
- Gill CO, Jones T. (1995) The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. *Food Microbiol*; 12: 135–141.
- Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G, Tyler S, Kent H, Trout-Yakel KM, Larios O, Allen V, Lee B, Nadon C. (2010) High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*;11:120.
- Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendevre JL, Carlier V, Ermel G. (1999) *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int J Food Microbiol*;53:127-40.
- Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, García-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM,

- Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Díaz JC, Purcell R, Rimmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*;294:849-52.
- Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. (2003) Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*;47(2):704-8.
- Gómez D, Azón E, Marco N, Carramiñana JJ, Rota C, Ariño A, Yangüela J: Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol*;42:61-5.
- Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC. (2012) Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis*;54:652-60.
- Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao TT, Courvalin P, Brisabois A. (2011) Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol*;77:2788-90.
- Graves LM y Swaminathan B. (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*;65:55-62.
- Graves LM, Swaminathan B, Hunter SB. (2007) Subtyping *Listeria monocytogenes*. En: *Listeria, listeriosis and food safety* (eds. Ryser ET y Mart EH). CRC Press, Boca Raton, FL, EE. UU., págs. 283-301.
- Gray MJ, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, Scott VN, Gombas DE, Boor KJ, Wiedmann M. (2004) *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl Environ Microbiol*;70:5833-41.
- Gudmundsdóttir S, Gudbjörnsdóttir B, Lauzon HL, Einarsson H, Kristinsson KG, Kristjánsson M. (2005) Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*;101:41-51.
- Halpin JL, Garret NM, Ribot EM, Graves LM, Cooper KL. (2010) Re-evaluation, Optimization, and Multilaboratory Validation of the PulseNet-Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis*;7: 293-98.
- Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. (2007) Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol*;24:380-92.
- Hegde V, Leon-Velarde CG, Stam CM, Jaykus LA, Odumeru JA. (2007) Evaluation of BBL CHROMagar *Listeria* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *J Microbiol Methods*;68:82-7.
- Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. (2010) Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist*;16:91-104.

- Heir E, Lindstedt BA, Røtterud OJ, Vardund T, Kapperud G, Nesbakken T. (2004) Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *Int J Food Microbiol*;96:85-96.
- Hein I, Klinger S, Dooms M, Flekna G, Stessl B, Leclercq A, Hill C, Allerberger F, Wagner M. (2011) Stress survival islet 1 (SSI-1) survey in *Listeria monocytogenes* reveals an insert common to *Listeria innocua* in sequence type 121 *L. monocytogenes* strains. *Appl Environ Microbiol*;77:2169-2173.
- Hellström S, Laukkanen R, Siekkinen KM, Ranta J, Maijala R, Korkeala H. (2010) *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *J Food Prot*; 73:641-8.
- Henson J, Tischler G, Ning Z. (2012) Next-generation sequencing and large genome assemblies. *Pharmacogenomics*;13:901-15.
- Hereu A, Bover-Cid S, Garriga M, Aymerich T. (2012) High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*;154:107-12.
- Hernandez-Milian A, Payeras-Cifre A. (2014) What is new in listeriosis? *Biomed Res Int*;2014:358051.
- Hill C, Cotter PD, Sleator RD, Gahan CG. (2002) Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int Dairy Journal*;12: 273-283.
- Hitchins AD, Jinneman K. (2011) Chapter 10, Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual (vía web). Accesible en <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>
- Holah JT, Taylor JH, Dawson DJ, Hall KE. (2002) Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*;92:111S-20S.
- Holch A, Webb K, Lukjancenko O, Ussery D, Rosenthal BM, Gram L. (2013) Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Appl Environ Microbiol*;79:2944-51.
- Houari A, Di Martino P. (2007) Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial *biofilm* formation. *Lett Appl Microbiol*;45:652-6.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich MT & Monfort, JM. (1995) Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J Appl Microbiol*;79: 322–330.
- Hugas M, Pages F, Garriga M, Monfort J. (1998) Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol*;15:639–50.
- Hugas M, Garriga M, Pascual M, Aymerich MT, Monfort JM. (2002) Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiol*;19:519–28.

- Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. (2005) Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*;43:1045-50.
- Hunter PR, Gaston MA. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*;26:2465-6.
- ISO. (1996) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standar ISO 11290-1. International Organization for Standardisation. Ginebra. Suiza.
- ISO. (1998) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration. International Standar ISO 11290-2. International Organization for Standardisation. Ginebra. Suiza.
- ISO. (2004) Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. ISO 11290-1: 19967Amd 1: 2004. International Organization for Standarization. Ginebra. Suiza.
- Jackson KA, Biggerstaff M, Tobin-D'Angelo M, Sweat D, Klos R, Nosari J, Garrison O, Boothe E, Saathoff-Huber L, Hainstock L, Fagan RP. (2011) Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. *J Food Prot*;74:949-53.
- Jacquet C, Doumith M, Gordon JJ, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. (2004) A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis*;189:2094-100.
- Jadhav S, Bhawe M, Palombo EA. (2012) Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods*;88:327-41.
- Jantzen MM, Navas J, de Paz M, Rodríguez B, da Silva WP, Nuñez M, Martínez-Suárez JV. (2006a) Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Lett Appl Microbiol*;43:313-7.
- Jantzen MM, Navas J, Corujo A, Moreno R, López V, Martínez-Suárez JV. (2006b) Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span.J.Agric.Res*;4:235-47.
- Jensen A, Larsen MH, Ingmer H, Vogel BF, Gram L. (2007) Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *J Food Prot*;70:592-9.
- Jensen A, Thomsen LE, Jørgensen RL, Larsen MH, Roldgaard BB, Christensen BB, Vogel BF, Gram L, Ingmer H. (2008) Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *Int J Food Microbiol*;123:254-61.

- Jiménez-Colmenero F, Ventanas J, Toldrá F. (2010) Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science*;84:585-93.
- Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. (2004) mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics*;5:86.
- Kabuki DY, Kuaye AY, Wiedmann M, Boor KJ. (2004) Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh-cheese processing plants. *J Dairy Sci*;87:2803-12.
- Kanuganti SR, Wesley IV, Reddy PG, McKean J, Hurd HS. (2002) Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. *J Food Prot*;65:1470-4.
- Kastbjerg VG, Gram L. (2009) Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*;106:1667-81.
- Kastbjerg VG, Gram L. (2012) Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. *Int J Food Microbiol*;160:11-5.
- Kastbjerg VG, Hein-Kristensen L, Gram L. (2014) Triclosan-induced aminoglycoside-tolerant *Listeria monocytogenes* isolates can appear as small-colony variants. *Antimicrob Agents Chemother*;58:3124-32.
- Kathariou S. (2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot*;65:1811-29.
- Kathariou S, Graves L, Buchrieser C, Glaser P, Siletzky RM, Swaminathan B. (2006) Involvement of closely related strains of a new clonal group of *Listeria monocytogenes* in the 1998-99 and 2002 multistate outbreaks of foodborne listeriosis in the United States. *Foodborne Pathog Dis*;3:292-302.
- Kent WJ. (2002) BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*;12:656-64.
- Keto-Timonen R, Tolvanen R, Lundén J, Korkeala H. (2007) An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *J Food Prot*;70:1866-73.
- Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. (2010) Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Microbiol Methods*;80:134-7.
- Kim H, Marquis H, Boor KJ. (2005) SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of *inlA* and *inlB*. *Microbiology*;151:3215-22.
- Kornacki JL, Gurtler JB. (2007) Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in food processing facilities. En: *Listeria, listeriosis and food safety* (eds. Ryser ET y Mart EH). CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU., págs. 681-766.
- Kovacevic J, Arguedas-Villa C, Wozniak A, Tasara T, Allen KJ. (2013) Examination of food chain-derived *Listeria monocytogenes* strains of different serotypes reveals considerable diversity in *inlA* genotypes, mutability, and adaptation to cold temperatures. *Appl Environ Microbiol*;79:1915-22.
- Kuenne C, Billion A, Mraheil MA, Strittmatter A, Daniel R, Goesmann A, Barbuddhe S, Hain T, Chakraborty T. (2013) Reassessment of the *Listeria monocytogenes*

- pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics*;14:47.
- Laksanalamai P, Joseph LA, Silk BJ, Burall LS, L Tarr C, Gerner-Smidt P, Datta AR. (2012) Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US. *PLoS One*;7:e42448.
- Langsrud S, Sundheim G. (1998) Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. *J Appl Microbiol*;85:1006-12.
- Lappi VR, Thimothe J, Nightingale KK, Gall K, Scott VN, Wiedmann M. (2004) Longitudinal studies on *Listeria* in smoked fish plants: impact of intervention strategies on contamination patterns. *J Food Prot*;67:2500-14.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. (2012) Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*;50:1355-61.
- Lauer WF, Facon JP, Patel A. (2005) Evaluation of a chromogenic medium for identification and differentiation of *Listeria monocytogenes* in selected foods. *J AOAC Int*;88:511-7.
- Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. (2015) Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*;5:770.
- Lebert I, Leroy S, Giammarinaro P, Lebert A, Chacornac JP, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC, Talon R. (2007) Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*;76:112-122.
- Lebrun M, Audurier A, Cossart P. (1994) Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917. *J Bacteriol*;176:3049-61.
- Lecuit M, Leclercq A. (2012) Rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des *Listeria* e Année 2011. Institut Pasteur, Paris, France. <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004j-03q/ra-cnr-listeria-2011.pdf>.
- Lemon KP, Freitag NE, Kolter R. (2010) The virulence regulator PrfA promotes *biofilm* formation by *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*;192:3969-76.
- Leroy F, De Vuyst L. (1999) Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microbiol*;65:974-81.
- Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol*;106:270-85.
- Lianou A, Stopforth JD, Yoon Y, Wiedmann M, Sofos JN. (2006) Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *J Food Prot*;69:2640-47.

- Lin CM, Takeuchi K, Zhang L, Dohm CB, Meyer JD, Hall PA, Doyle MP. (2006) Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. J Food Prot;69:71-9.
- Lindbäck T, Secic I, Rørvik LM. (2011) A contingency locus in *prfA* in a *Listeria monocytogenes* subgroup allows reactivation of the PrfA virulence regulator during infection in mice. Appl Environ Microbiol;77:3478-83.
- Lindblad M, Lindmark H, Lambertz ST, Lindqvist R. (2007) Microbiological baseline study of swine carcasses at Swedish slaughterhouses. J Food Prot;70:1790-7.
- Little CL, Pires SM, Gillespie IA, Grant K, Nichols GL. (2010) Attribution of human *Listeria monocytogenes* infections in England and Wales to ready-to-eat food sources placed on the market: adaptation of the Hald *Salmonella* source attribution model. Foodborne Pathog Dis;7:749-56.
- Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. (2007) Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. Int J Food Microbiol;118:101-15.
- Lourenço A, Machado H, Brito L. (2011) Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. J Food Sci;76:M143-8.
- López V, Ortiz S, Corujo A, López P, Navas J, Moreno R, Martínez-Suárez JV. (2007) Traceback identification of an ingredient (pork dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. J Food Prot;70:1513-7.
- López V, Ortiz S, Corujo A, López P, Poza D, Navas J, Moreno R, Martínez-Suárez JV. (2008) Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. Poult Sci;87:1874-82.
- López V, Navas J, Martínez-Suárez JV. (2013) Low potential virulence associated with mutations in the *inlA* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* isolated from raw retail poultry meat. J Food Prot;76:129-32.
- López-Bote DJ. (1998) Sustained utilization of the iberian pig breed. Meat Science; 49: 17-27.
- Lundén JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ. (2000) Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. J Food Prot;63:1204-7.
- Lundén JM, Autio TJ, Korkeala HJ. (2002) Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. J Food Prot;65:1129-33.
- Lundén J, Autio T, Markkula A, Hellström S, Korkeala H. (2003a) Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. Int J Food Microbiol;82:265-72.
- Lundén JM, Autio TJ, Sjöberg AM, Korkeala HJ. (2003b) Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. J Food Prot;66:2062-9.

- Lungu B, O'Bryan CA, Muthaiyan A, Milillo SR, Johnson MG, Crandall PG, Ricke SC. (2011) *Listeria monocytogenes*: Antibiotic Resistance in Food Production. *Foodborne Pathog Dis*;8:569-78.
- Lyon SA, Berrang ME, Fedorka-Cray PJ, Fletcher DL, Meinersmann RJ. (2008) Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing plant. *Foodborne Pathog Dis*;5:253-9.
- Machado I, Graça J, Sousa AM, Lopes SP, Pereira MO (2011) Effect of antimicrobial residues on early adhesion and biofilm formation by wild-type and benzalkonium chloride-adapted *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*;27.
- Machado I, Lopes SP, Sousa AM, Pereira MO. (2012) Adaptative response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms to benzalkonium chloride. *J Basic Microbiol*;52:43-52.
- Madeo M, Musumeci R, Careddu AM, Amato E, Pontello MM, Cocuzza CE. (2014) Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in northern Italy, 2008-2010: MIC determination according to EUCAST broth microdilution method. *J Chemother*:1973947814Y0000000187.
- Malley TJ, Butts J, Wiedmann M. (2015) Seek and destroy process: *Listeria monocytogenes* process controls in the ready-to-eat meat and poultry industry. *J Food Prot*;78:436-445.
- Markkula A, Autio T, Lundén J, Korkeala H. (2005) Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. *J Food Prot*;68:1228-31.
- Martin P, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, De Valk H. (2006) Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis*;3:303-8.
- Martín B, Perich A, Gómez D, Yangüela J, Rodríguez A, Garriga M, Aymerich T. (2014) Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiol*;44:119-127.
- Martínez-Campos G, Martínez-Suárez JV, Aguado-Urda M, López V. (2012) Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens. *SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*. DOI 10.1007/978-1-4614-3250-0_1.
- Mataragas M, Bellio A, Rovetto F, Astegiano S, Decastelli L, Cocolin L. (2015) Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. *Meat Sci*;103:39-45.
- McDonell G, Russell AD. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*;12:147-79.
- McLauchlin J. (1990) Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;9:210-3.
- MacLean RC, Vogwill T. (2014) Limits to compensatory adaptation and the persistence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Evol Med Public Health*;5:4-12.

- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*;5:607-25.
- Meinersmann RJ, Phillips RW, Wiedmann M, Berrang ME. (2004) Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Appl Environ Microbiol*;70:2193-203.
- Meloni D, Piras F, Mureddu A, Fois F, Consolati SG, Lamon S, Mazzette R. (2013) *Listeria monocytogenes* in five Sardinian swine slaughterhouses: prevalence, serotype, and genotype characterization. *J Food Prot.*;76:1863-7.
- MENSURA (2000) Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioter*; 13:73-86.
- Mereghetti L, Quentin R, Marquet-Van Der Mee N, Audurier A. (2000) Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol*;66:5083-6.
- Miettinen MK, Björkroth KJ, Korkeala HJ. (1999) Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*;46:187-92.
- Milisavljevic V, Tran LP, Batmalle C, Bootsma H. (2008) Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. *Am J Infect Control*;36:552-8.
- Morales P, Calzada J, Nuñez M. (2006) Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged Iberian and Serrano cured hams. *J Food Prot*;69:2539-43.
- Moretrø T, Langsrud S. (2004) *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*;1:107-121.
- Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. (2010) Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother*;54:2728-31.
- Muhterem-Uyar M, Dalmaso M, Sorin Bolocan A, Hernandez M, Kapetanakou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovicova J, Nicolau AI, Rovira J, Skandamis PN, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D, Stessl B, Wagner M. (2015) Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*;51:94-107.
- Mullapudi S, Siletzky RM, Kathariou S. (2008) Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey-processing plants. *Appl Environ Microbiol*;74:1464-8.
- Müller A, Rychli K, Muhterem-Uyar M, Zaiser A, Stessl B, Guinane CM, Cotter PD, Wagner M, Schmitz-Esser S. (2013) Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One*;8:e76835.
- Müller A, Rychli K, Zaiser A, Wieser C, Wagner M, Schmitz-Esser S. (2014) The *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188 provides increased tolerance to

- various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS Microbiol Lett*;361:166-173.
- Murray EGD, Webb RA y Swann MBR. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed *Bacillus Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Path. Bacteriol*;29:407-439.
- Nakamura H, Takakura K, Sone Y, Itano Y, Nishikawa Y. (2013) Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J Food Prot*;76:1179-86.
- Navas J, Jantzen MM, Martínez Suárez JV. (2006) Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en el procesado de alimentos: mecanismos moleculares de la respuesta al estrés. *Alimentaria*, marzo:60-67.
- Navas J, Ortiz S, López P, López V, Martínez-Suárez JV. (2007) Different enrichment procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from raw chicken samples can affect the results of detection (by chromogenic plating or real-time PCR) and lineage or strain identification. *J Food Prot*;70:2851-4.
- Nelson KE, Fouts DE, Mongodin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, Rasko DA, Angiuoli SV, Gill SR, Paulsen IT, Peterson J, White O, Nelson WC, Nierman W, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Haft DH, Selengut J, Van Aken S, Khouri H, Fedorova N, Forberger H, Tran B, Kathariou S, Wonderling LD, Uhlich GA, Bayles DO, Luchansky JB, Fraser CM. (2004) Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res*;32:2386-95.
- Neves E, Lourenço A, Silva AC, Coutinho R, Brito L. (2008a) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Syst Appl Microbiol*;31:387-92.
- Neves E, Silva AC, Roche SM, Velge P, Brito L. (2008b) Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. *J Med Microbiol*;57:411-5.
- Nightingale KK, Windham K, Martin KE, Yeung M, Wiedmann M. (2005) Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*;71:8764-72.
- Nightingale KK, Lyles K, Ayodele M, Jalan P, Nielsen R, Wiedmann M. (2006) Novel method to identify source-associated phylogenetic clustering shows that *Listeria monocytogenes* includes niche-adapted clonal groups with distinct ecological preferences. *J Clin Microbiol*;44:3742-51.
- Nightingale KK, Ivy RA, Ho AJ, Fortes ED, Njaa BL, Peters RM, Wiedmann M. (2008) *inlA* premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. *Appl Environ Microbiol*;74:6570-83.

- Nightingale K. (2010) *Listeria monocytogenes*: knowledge gained through DNA sequence-based subtyping, implications, and future considerations. J AOAC Int.;93:1275-86.
- Nilsson RE, Ross T, Bowman JP. (2011) Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. Int J Food Microbiol;150:14-24.
- Nørnung B, Andersen JK. (2000) Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol;30:228-32.
- Notermans SH, Dufrenne J, Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. (1991) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Appl Environ Microbiol;57:2666-70.
- Nucera D, Lomonaco S, Bianchi DM, Decastelli L, Grassi MA, Bottero MT, Civera T. (2010) A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. Int J Food Microbiol;140:271-6.
- Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelski AD, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, Clingenpeel SR, Woyke T, McLean JS, Lasken R, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. (2013) Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. J Comput Biol;20:714-37.
- O'Connor L, O'Leary M, Leonard N, Godinho M, O'Reilly C, Coffey L, Egan J, O'Mahony R. (2010) The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. Lett Appl Microbiol;51:490-8.
- Ochiai Y, Yamada F, Mochizuki M, Takano T, Hondo R, Ueda F. (2014) Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* strains. J Food Prot;77:133-40.
- Ollinger J, Bowen B, Wiedmann M, Boor KJ, Bergholz TM. (2009) *Listeria monocytogenes* sigmaB modulates PrfA-mediated virulence factor expression. Infect Immun;77:2113-24.
- Olsen SJ, Patrick M, Hunter SB, Reddy V, Kornstein L, MacKenzie WR, Lane K, Bidol S, Stoltman GA, Frye DM, Lee I, Hurd S, Jones TF, LaPorte TN, Dewitt W, Graves L, Wiedmann M, Schoonmaker-Bopp DJ, Huang AJ, Vincent C, Bugenhagen A, Corby J, Carloni ER, Holcomb ME, Woron RF, Zansky SM, Dowdle G, Smith F, Ahrabi-Fard S, Ong AR, Tucker N, Hynes NA, Mead P. (2005) Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. Clin Infect Dis;40:962-7.
- Orsi RH, Sun Q, Wiedmann M. (2008) Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes*. BMC Evol Biol;8:233.
- Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microbiol;301:79-96.
- Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997) Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Ind. Aliment;36:1-3.

- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*;42:D206-14.
- Pagedar A, Singh, J, Batish, VK. (2012) Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin. *J Dairy Res*;79:383-9.
- Palá TR, Sevilla A. (2004) Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant. *J Food Prot*;67:1624-9.
- Pan Y, Breidt F Jr, Kathariou S. (2006) Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol*;72:7711-7.
- Pan Y, Breidt F Jr, Gorski L. (2010) Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on *biofilm* formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Appl Environ Microbiol*;76:1433-41.
- Phan-Thanh L. (1998) Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J Gen Appl Microbiol*;44:183-191.
- Peccio A, Autio T, Korkeala H, Rosmini R, Trevisani M. (2003) *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Lett Appl Microbiol*;37:234-8.
- Piddock LJ. (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*;19:382–402.
- Pirie JH. (1940) The genus *Listerella* Pirie. *Science*;91:383.
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. (2006) Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol*;208:215-23.
- Pizarro-Cerdá J, Kühbacher A, Cossart P. (2012) Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med*;2i: a010009.
- Poyart-Salmeron C, Trieu-Cuot P, Carlier C, MacGowan A, McLauchlin J, Courvalin P. (1992) Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*;36:463-6.
- Pricope L, Nicolau A, Wagner M, Rychli K. (2013) The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on invasiveness and intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*;31:1 230-235.
- Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM, Deighton MA. (2010) Antibiotic susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*;27:9-16.
- Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S. (2008) A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog*;4:e1000146.
- Rakic-Martinez M, Drevets DA, Dutta V, Katic V, Kathariou S. (2011) *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin,

- gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds. *Appl Environ Microbiol*;77:8714-21.
- Reissbrodt R. (2004) New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.--an overview. *Int J Food Microbiol*;95:1-9.
- Renier S, Hébraud M, Desvaux M. (2011) Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ Microbiol*;13:835-50.
- Restaino L, Frampton EW, Irbe RM, Schabert G, Spitz H. (1999) Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Food Prot*;62:244-51.
- Revazishvili T, Kotetishvili M, Stine OC, Kreger AS, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. (2004) Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing *Listeria monocytogenes* strains isolated from environmental and clinical sources. *J Clin Microbiol*;42:276-85.
- Ripio MT, Domínguez-Bernal G, Lara M, Suárez M, Vazquez-Boland JA. (1997) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*;179:1533-40.
- Riley LW. (2004) Molecular epidemiology of infectious diseases: Principles and practises. ASM Press, Washintong, D.C.
- Roberts A, Chan Y, Wiedmann M. (2005) Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. *Appl Environ Microbiol*;71:3900-10.
- Roche SM, Gracieux P, Milohanic E, Albert I, Virlogeux-Payant I, Témoin S, Grépinet O, Kerouanton A, Jacquet C, Cossart P, Velge P. (2005) Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*;71:6039-48.
- Roche SM, Grépinet O, Corde Y, Teixeira AP, Kerouanton A, Témoin S, Mereghetti L, Brisabois A, Velge P. (2009) A *Listeria monocytogenes* strain is still virulent despite nonfunctional major virulence genes. *J Infect Dis*;200:1944-8.
- Roche SM, Grépinet O, Kerouanton A, Ragon M, Leclercq A, Témoin S, Schaeffer B, Skorski G, Mereghetti L, Le Monnier A, Velge P. (2012) Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. *BMC Microbiol*;12:304.
- Rocourt J y Buchrieser C. (2007) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* : phylogenetic position, taxonomy and identification. En: *Listeria*, listeriosis, and food safety (eds. Ryser ET y Marth EH). CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU., págs. 1-20.
- Rodríguez-Lázaro D, Lombard B, Smith H, Rzezutka A, D'Agostino M, Helmuth R, Schroeter A, Malorny B, Miko A, Guerra B. (2007) Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and

- genetically modified organisms. Trends in Food Science & Technology;18:306-19.
- Roldgaard BB, Andersen JB, Hansen TB, Christensen BB, Licht TR. (2009) Comparison of three *Listeria monocytogenes* strains in a guinea-pig model simulating food-borne exposure. FEMS Microbiol Lett;291:88-94.
- Romanova NA, Wolffs PF, Brovko LY, Griffiths MW. (2006) Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. Appl Environ Microbiol;72:3498-503.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A;74:5463-7.
- Sauders BD, Overdevest J, Fortes E, Windham K, Schukken Y, Lembo A, Wiedmann M. (2012) Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. Appl Environ Microbiol;78:4420-33.
- Schillinger U, Kaya M, Lücke FK. (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J Appl Bacteriol;70:473-8.
- Schlech WF 3rd, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV. (1983) Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. N Engl J Med;308:203-6.
- Schmitz-Esser S, Müller A, Stessl B, Wagner M. (2015) Genomes of sequence type 121 *Listeria monocytogenes* strains harbor highly conserved plasmids and prophages. Front Microbiol;6:380.
- Schnupf P, Portnoy DA. (2007) Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. Microbes Infect;9:1176-87.
- Schoder D, Strauß A, Szakmary-Brändle K, Stessl B, Schlager S, Wagner M. (2015) Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. Int J Food Microbiol;209:3-12.
- Schwartz B, et al. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken (1998). Lancet;2:779-82.
- Seeliger HPR, Jones, D. (1986). Genus *Listeria*. En: Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. (eds. Kandler O y Weiss N). Williams and Wilkins, Baltimore, págs.1235–45.
- Severino P, Dussurget O, Vêncio RZ, Dumas E, Garrido P, Padilla G, Piveteau P, Lemaître JP, Kunst F, Glaser P, Buchrieser C. (2007) Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response. Appl Environ Microbiol;73:6078-88.
- Shapiro RS. (2015) Antimicrobial-induced DNA damage and genomic instability in microbial pathogens. PLoS Pathog;11:e1004678.
- Shemesh M, Kolter, R, Losick, R. (2010) The biocide chlorine dioxide simulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. J Bacteriol;192:6352-6.

- Shetty A, McLauchlin J, Grant K, O'Brien D, Howard T, Davies EM. (2009) Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *J Hosp Infect*;72:332-6.
- Sidhu MS, Sørum H, Holck A. (2002) Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. *Microb Drug Resis*;8:393-9.
- Simpson CA, Geornaras I, Yoon Y, Scanga JA, Kendall PA, Sofos JN. (2008) Effect of inoculum preparation procedure and storage time and temperature on the fate of *Listeria monocytogenes* on inoculated salami. *J Food Prot*;71:494-501.
- Soumet C, Ragimbeau C, Maris P. (2005) Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Lett Appl Microbiol*;41:291-6.
- Stasiewicz MJ, Oliver HF, Wiedmann M, den Bakker HC. (2015) Whole genome sequencing allows for improved identification of persistent *Listeria monocytogenes* in food associated environments. *Appl Environ Microbiol*;81:6024-37.
- Stiles M, Hastings J. (1991) Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology*;2:247-51.
- Stessl B, Luf W, Wagner M, Schoder D. (2009) Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*;106:651-9.
- Stessl B, Rückerl I, Wagner M. (2014) Multilocus sequence typing (MLST) of *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol*;1157:73-83.
- Stoll R, Mertins S, Joseph B, Müller-Altroch S, Goebel W. (2008) Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media. *Microbiology*;154:3856-76.
- Stopforth JD, Samelis J, Sofos JN, Kendall PA, Smith GC. (2002) Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *J Food Prot*;65:1717-27.
- Tamburro M, Ripabelli G, Fanelli I, Grasso GM, Sammarco ML. (2010) Typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Italy by *inlA* gene characterization and evaluation of a new cost-effective approach to antisera selection for serotyping. *J Appl Microbiol*;108:1602-11.
- Tamburro M, Ripabelli G, Vitullo M, Dallman TJ, Pontello M, Amar CF, Sammarco ML. (2015) Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*;40:31-9.
- Tardif G, Sulavik MC, Jones GW, Clewell DB. (1989) Spontaneous switching of the sucrose-promoted colony phenotype in *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun*;57:3945-8.
- Tezel U, Pavlostathis SG. (2011) Role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment. En: *Antimicrobial resistance in the environment* (ed. Keen PL, Montforts MHMM). John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, EE.UU., págs. 349-87.

- Tham W, Ericsson H, Loncarevic S, Unnerstad H, Danielsson-Tham ML. (2000) Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int J Food Microbiol*;62:173-5.
- Thévenot D, Delignette-Muller ML, Christieans S, Vernozy-Rozand C. (2005a) Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int J Food Microbiol*;101:189-200.
- Thévenot D, Delignette-Muller ML, Christieans S, Vernozy-Rozand C. (2005b) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int J Food Microbiol*;102:85-94.
- Thévenot D, Dernburg A, Vernozy-Rozand C. (2006) An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J Appl Microbiol*;101:7-17.
- To MS, Favrin S, Romanova N, Griffiths MW. (2002) Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*;68:5258-64.
- Tompkin RB. (2002) Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot*;65:709-25.
- Työppönen S, Petäjä E & Mattila-Sandholm T. (2003) Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int J Food Microbiol*;83:233-244.
- Ueda S, Kuwabara Y. (2010) Evaluation of an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Listeria monocytogenes* from food. *Biocontrol Sci*;15:91-5.
- USDA. (2012) FSIS Procedure for the Use of a *Listeria monocytogenes* Polymerase Chain Reaction (PCR) Screening Test. Revision 05. En: Microbiology Laboratory Guidebook (vía web). Accesible en http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8A_05.pdf
- USDA. (2013) Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. Revision 09. En: Microbiology Laboratory Guidebook (vía web). Accesible en http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_09.pdf
- Van Stelten A, Simpson JM, Ward TJ, Nightingale KK. (2010) Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. *Appl Environ Microbiol*;76:2783-90.
- Vasanthakrishnan RB, de Las Heras A, Scotti M, Deshayes C, Colegrave N, Vázquez-Boland JA. (2015) PrfA regulation offsets the cost of *Listeria* virulence outside the host. *Environ Microbiol*. 2015 Jul 14. doi: 10.1111/1462-2920.12980. [Epub ahead of print].
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*;14:584-640.
- Velge P, Herler M, Johansson J, Roche SM, Témoin S, Fedorov AA, Gracieux P, Almo SC, Goebel W, Cossart P. (2007) A naturally occurring mutation K220T in the pleiotropic activator PrfA of *Listeria monocytogenes* results in a loss of virulence due to decreasing DNA-binding affinity. *Microbiology*;153:995-1005.

- Velge P, Roche SM. (2010) Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiol*;5:1799-821.
- Verghese B, Lok M, Wen J, Alessandria V, Chen Y, Kathariou S, Knabel S. (2011) comK prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Appl Environ Microbiol*;77:3279-92.
- Vitas AI, Sánchez RM, Aguado V, García-Jalón I. (2007) Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain. *J Food Prot*;70:2402-6.
- Von Laer AE, Saldanha de Lima A, Dos Santos Trinidad P, Andriguetto C, Destro MT, Padilha da Silva, W. (2009) Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. *Brazilian J of Microbiol*;40:574-82.
- Wadud S, Leon-Velarde CG, Larson N, Odumeru JA. (2010) Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria* chromogenic agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J Microbiol Methods*;81:153-9.
- Ward TJ, Evans P, Wiedmann M, Usgaard T, Roof SE, Stroika SG, Hise K. (2010) Molecular and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* from U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service surveillance of ready-to-eat foods and processing facilities. *J Food Prot*;73:861-9.
- Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol*;65:286-92.
- Wesley IV, Larsen S, Hurd HS, McKean JD, Griffith R, Rivera F, Nannapaneni R, Cox M, Johnson M, Wagner D, de Martino M. (2008) Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in cull sows and pork. *J Food Prot*;71:545-9.
- Wiedmann M. (2002) Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int*; 85:524-31.
- Willis C, Baalham T, Greenwood M, Presland F. (2006) Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *J Appl Microbiol*;101:711-7.
- Wulff G, Gram L, Ahrens P, Vogel BF. (2006) One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Appl Environ Microbiol*;72:4313-22.
- Yan H, Neogi SB, Mo Z, Guan W, Shen Z, Zhang S, Li L, Yamasaki S, Shi L, Zhong N. (2010) Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. *Int J Food Microbiol*;144:310-6.
- Yang H, Qu L, Wimbrow AN, Jiang X, Sun Y. (2007) Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int J Food Microbiol*;118:132-8.

- Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ. (2004) Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*;70:913-20.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. (2011) PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res*;39:347-52.
- Zhu X, Liu W, Lametsch R, Aarestrup F, Shi C, She Q, Shi X, Knøchel S. (2011) Phenotypic, proteomic, and genomic characterization of a putative ABC-transporter permease involved in *Listeria monocytogenes* *biofilm* formation. *Foodborne Pathog Dis*;8:495-501.

El trabajo de esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos, que han sido publicados o se encuentran en preparación:

- López, V., Villatoro, D., Ortiz, S., López, P., Navas, J., Dávila, J. C., Martínez-Suárez, J. V. 2008. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Science* 78: 130-134.
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., Martínez-Suárez, J. V. 2010. A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 1177-1184.
- Ortiz, S., Lopez, V., Garriga, M., Martinez-Suarez, J. V. 2014. Antilisterial effect of two bioprotective cultures in a model system of Iberian chorizo fermentation. *International Journal of Food Science & Technology* 49: 753-758.
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology* 39: 81-88.
- Ortiz, S., López, P., López, V., Martínez-Suárez, J. V. 2014. Antibiotic susceptibility in benzalkonium chloride-resistant and -susceptible *Listeria monocytogenes* strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 11: 517-519.
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. 2014. The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 189: 106-112. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.007.
- López-Alonso, V., Ortiz, S., Martínez-Suárez, J. V. 2015. Genome sequences of five disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two Iberian pork processing plants. *Genome Announcements* 3(2):e00077-15. doi:10.1128/genomeA.00077-15.
- Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., Martínez-Suárez, J. V. The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants. En preparación.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., López-Alonso, V. Review. Potential impact of reduced susceptibility to quaternary ammonium disinfectants on *Listeria monocytogenes* persistence in food processing environments. En preparación.
- López-Alonso, V., Ortiz, S., Martínez-Suárez, J. V. Naturally-occurring prfA mutants of *Listeria monocytogenes* as related to environmental persistence and disinfectant resistance along an Iberian pork supply chain. En preparación..

